

ETUDE DE LA CONCENTRATION EN IMMUNOGLOBULINES DES SÉCRÉTIONS MAMMAIRES DE LA CHIENNE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

BERTIERI Marie-Blanche

Née, le 10 Mai 1988 à VICHY (03)

Directeur de thèse : Mme Sylvie CHASTANT-MAILLARD

JURY

PRESIDENT :

M. Antoine BLANCHER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Sylvie CHASTANT-MAILLARD

Mme Séverine BOULLIER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :

Etude de la concentration en immunoglobulines des sécrétions mammaires de la chienne.

THÈSE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE
DIPLÔME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2012
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Marie-Blanche BERTIERI
Née le 10 mai 1988 à Vichy (Allier)

Directeur de thèse : Mme le Professeur Sylvie CHASTANT-MAILLARD

JURY

PRESIDENT :

M. Antoine BLANCHER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

Mme Sylvie CHASTANT-MAILLARD

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Mme Séverine BOULLIER

Maître de Conférences à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Antoine BLANCHER

Professeur des Universités

Praticien hospitalier

Chef de service du laboratoire d'*Immunologie*,

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,
Hommages respectueux.

A Madame le Docteur Sylvie CHASTANT-MAILLARD

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Pathologie de la reproduction,

Qui a nous a confié ce sujet et guidé dans l'élaboration de ce travail,
Pour son soutien, sa patience et sa gentillesse,
Sincères remerciements.

A Madame le Docteur Séverine BOULLIER

Maitre de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

Immunologie,

Qui a très aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse,
Sincères remerciements.

REMERCIEMENTS

A ma Maman,

Pour ton soutien infaillible durant ces longues années, et tout ton amour.

A mon Papa, pour les valeurs que tu m'as inculquées, et à **ma Fanfan,** pour ton amour de grande sœur, vous me manquez tous les jours, je ne vous oublie pas.

A André, pour ton soutien et ces précieux moments passés ensemble.

A Mamie, malgré le peu de temps passé ensemble, tu m'as tant apporté.

A tous mes amis,

A Emmanuel, mon grand frère de cœur, pour nos discussions passionnées et sans tabous,

A Marie-Emmanuelle et Gaëlle, pour cette amitié qui perdure depuis le lycée et malgré les kilomètres qui nous séparent,

A Emile, mon amie de prépa, qui a rendu cette épreuve plus facile,

A Guillaume, mon Gus, pour notre amitié si précieuse tant dans les mauvais que les très bons moments partagés,

A Elsa, Marie, Chloé, Laetitia, Robin, qui ont donné chaque jour un sens au mot « amitié », et Julie, Morgane, Simon, Mel, Maud qui ont constitué ce merveilleux groupe à l'ENVT, et à tous les gens de l'ENVT qui ont rendu ces 5 années formidables,

A Sandra, pour ta présence et ton constant soutien,

A Leslie, Marielle et Nelson, pour cette formidable aventure canadienne,

A Pascale, Guy et Sabine, pour votre accueil et votre soutien,

A Pauline, en souvenir de nos rêves d'enfants,

A Swany et Tagada.

A tous ceux que je n'ai pas cités mais que je n'oublie pas, merci.

SOMMAIRE

Liste des figures	11
Liste des tableaux	13
Introduction	15
I) Les sécrétions mammaires	17
A. Phénomènes de sécrétion : la lactation	17
1. Les glandes mammaires	17
2. Mammogenèse	18
3. Colostrogenèse	19
4. Déclenchement de la lactation	19
5. Agalactie	20
6. Entretien de la lactation	21
7. Sevrage	21
B. Composition des sécrétions mammaires	22
1. Le colostrum.....	22
a. Protéines	22
a1. Immunoglobulines	22
a1_1. Immunoglobuline G.....	23
a1_2. Immunoglobuline M.....	24
a1_3. Immunoglobuline A.....	25
a2. Autres composants protéiques	26
b. Lipides	26
c. Lactose	26
d. Minéraux et vitamines	27
e. Eléments cellulaires	27
f. Antitrypsines	27
g. Autres	28
h. Evolution de la composition des sécrétions mammaires pendant la lactation...	28
II) Etude expérimentale.....	29

A. Matériels et méthodes	29
1. Animaux	29
2. Prélèvements	29
a. Sécrétions mammaires.....	30
b. Sérum	30
3. Dosage des immunoglobulines	30
a. Principe	30
b. Protocole	31
4. Analyse statistique	33
B. Résultats	34
1. Sécrétions mammaires	34
a. Population étudiée	34
b. Influence du numéro de la paire de mamelles	34
c. Cinétique de la concentration en Ig au cours de la lactation	35
c1. Ig G	35
c2. Ig M	36
c3. Ig A	37
c4. Importance relative des différentes classes d'Ig	38
c5. Importance relative des différentes classes d'Ig	39
d. Facteurs de variation de la qualité immunologique du colostrum	40
d1. Vaccination	40
d2. Taille et poids de la portée	41
2. Sérum	43
a. Cinétique de la concentration en Ig G sériques au cours de la lactation	43
b. Cinétique de la concentration en Ig M sériques au cours de la lactation.....	44
c. Cinétique de la concentration en Ig A sériques au cours de la lactation.....	45
3. Relation entre les concentrations sériques et colostrales en immunoglobulines	46
a. Ig G	46
b. Ig M	48
c. Ig A	49
d. Rapport entre les concentrations colostrales et sériques	50

III) Discussion	51
A. Limites de l'étude	51
1. Population étudiée	51
2. Période de suivi	51
3. Durée de gestation	52
4. Choix des classes d'Ig dosées	52
B. Composition en Ig des sécrétions mammaires de la chienne et facteurs d'influence..53	
1. Composition en Ig des sécrétions mammaires de la chienne	53
2. Proportion des Ig dans les sécrétions mammaires	55
3. Facteurs de variation	57
4. Concentration sérique en Ig	58
5. Lien entre les concentrations sériques et colostrales en Ig.....	60
a. Ig G.....	60
b. Ig M.....	60
c. Ig A	61
C. Perspectives : alternatives au colostrum pour l'acquisition de l'immunité passive ...	62
1. Immunité homospécifique	62
a. Sérum autologue	63
b. Colostrum congelé	64
c. Colostrum d'une chienne gravide	65
2. Immunité hétérosécifique	66
3. Voie d'administration	67
Conclusion.....	69
Bibliographie.....	71

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure d'un acinus mammaire, d'après Gayrard, 2007.

Figure 2 : Evolution hormonale (LH, progestérone et oestradiol) au cours du cycle sexuel chez la chienne gestante d'après Fontbonne et al. (2000).

Figure 3 : Structure d'une immunoglobuline G, molécule prototype des immunoglobulines, d'après Tizard (2009).

Figure 4 : Structure d'une immunoglobuline M (5 immunoglobulines reliées par la chaîne J), d'après Tizard (2009).

Figure 5 : Structure d'une immunoglobuline A, et d'une Ig A sécrétoire, d'après Tizard (2009).

Figure 6 : Concentration des immunoglobulines dans la sécrétion lactée entre J0 et J2 en fonction du numéro de paire de mamelles (n = 13)

Figure 7 : Evolution de la concentration en Ig G dans les sécrétions mammaires au cours de la lactation

Figure 8 : Evolution de la concentration en Ig M dans les sécrétions mammaires au cours de la lactation

Figure 9 : Evolution de la concentration en Ig A dans les sécrétions mammaires au cours de la lactation

Figure 10 : Evolution des concentrations en immunoglobulines au cours de la lactation chez la chienne

Figure 11 : Proportion des différents types d'immunoglobulines dans les sécrétions mammaires de chienne

Figure 12 : Influence du délai entre la vaccination et la mise-bas sur la concentration en immunoglobulines totales du colostrum

Figure 13 : Influence du nombre de chiots nés dans la portée sur la qualité du colostrum

Figure 14 : Influence du poids total de la portée sur la qualité du colostrum

Figure 15 : Influence du poids moyen des chiots par portée sur la qualité du colostrum.

Figure 16 : Concentrations en immunoglobulines G dans le sérum des chiennes durant la lactation.

Figure 17 : Concentrations en immunoglobulines M dans le sérum des chiennes durant la lactation.

Figure 18 : Concentrations en immunoglobulines A dans le sérum des chiennes durant la lactation .

Figure 19 : Relation entre les concentrations sériques et colostrales en Ig G.

Figure 20 : Relation entre les concentrations en Ig G dans le sérum et dans les sécrétions mammaires à 28 jours après la mise-bas.

Figure 21 : Relation entre les concentrations sériques et colostrales en Ig M.

Figure 22 : Relation entre les concentrations en Ig M dans le sérum et dans les sécrétions mammaires à 28 jours après la mise-bas.

Figure 23 Relation entre les concentrations sériques et colostrales en Ig A.

Figure 24 : Relation entre les concentrations en Ig A dans le sérum et dans les sécrétions mammaires à 28 jours après la mise-bas.

Figure 25 : Evolution de la proportion des différentes classes d'immunoglobulines dans les sécrétions mammaires de chienne au cours de la lactation, d'après Heddle et Rowley (1975).

Figure 26 : Evolution des différentes classes d'Ig dans les sécrétions mammaires d'une chienne durant la semaine précédant la mise-bas

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Concentration moyenne en nutriments des sécrétions mammaires au cours de la lactation chez 10 chiennes Beagle, d'après Adkins et al. (2001).

Tableau 2 : Anticorps de coating et de révélation.

Tableau 3 : Dilution des gammes.

Tableau 4 : Dilution des échantillons.

Tableau 5 : Synthèse des principales caractéristiques des portées étudiées.

Tableau 6 : Fourchette de variation de la concentration en immunoglobuline totale au cours de la lactation.

Tableau 7 : Moyenne du rapport Ig colostrale sur Ig sérique pour chaque classe d'Ig.

Tableau 8 : Synthèse bibliographique. Concentrations des différentes classes d'Ig dans les sécrétions mammaires de chiennes (en g/L).

Tableau 9 : Synthèse bibliographique : proportion des différentes classes d'Ig dans le colostrum canin.

Tableau 10 : Synthèse bibliographique : proportion des différentes classes d'Ig dans le colostrum canin

Tableau 11 : Synthèse bibliographique. Comparaison des concentrations sériques des différentes classes d'Ig en présence ou en l'absence de lactation.

INTRODUCTION

En 1980, plus de 103 000 chiots étaient inscrits au Livre des Origines Françaises (LOF). En 2010, on en recense plus de 198 000 (d'après la Société Centrale Canine <http://www.scc.asso.fr/Statistiques,242>), soit une augmentation de plus de 92% en 30 ans. L'élevage canin officiel est donc en nette progression, cela étant certainement dû à l'évolution de la société : place de l'animal de compagnie comme membre de la famille, solitude des personnes...

Ces chiffres sous-estiment l'importance de l'élevage puisqu'ils ne tiennent pas compte des animaux non inscrits.

Malgré ce fort développement de l'élevage canin, la mortalité néonatale demeure très élevée dans cette filière.

En l'absence de chiffres officiels, on estime le taux de mortalité en moyenne à 20 % des chiots entre la naissance et la 7^{ème} semaine (d'après Nielen et al., 1998). Cette mortalité est en réalité très variable, variant de 6% à 34% (Widmann et Acanal, 1992).

Le taux de mortalité est très élevé la première semaine de vie, et diminue après 21 jours d'âge. Le taux le plus élevé demeure celui des mort-nés, variant de 5,6 % (étude sur 457 portées de boxer, Nielen et al., 1998) à 10,9% (étude portant sur 4 races et 98 portées : irish wolfound, labrador retriever, léonberg et terre neuve, Indrebo et al., 2007). D'après ces mêmes études, la mortalité entre la naissance et 3 semaines post mise bas est respectivement de 10% et 6%. La mortalité entre 3 semaines et 8 semaines post mise bas est de 2% (Nielen et al, 1998). Cette mortalité néonatale et pédiatrique importante a non seulement un impact économique et émotionnel pour les éleveurs et les vétérinaires, mais elle a aussi des conséquences majeures sur l'économie de l'élevage et représente un sujet de préoccupation majeur en termes de bien-être animal.

Les causes de ces décès sont multiples. Pour les mort-nés, difficulté à la mise bas, immaturité du chiot, malformation congénitale sont les principales causes de décès (Gill, 2001). Ensuite, les causes infectieuses restent une cause majeure de mortalité néonatale, un agent a été retrouvé dans 32% à 61% des cas (Suter, 1997 ; Farstad, 1983). Ces infections peuvent être bactériennes et localisées (omphaloplébite, polyarthrites...) ou généralisées (brucellose, streptococcie, leptospirose). Elles peuvent être aussi virales, herpès virose, adénovirose et parvovirose. De plus, des affections multifactorielles combinant causes environnementales et agents infectieux sont possibles. On voit donc l'importance de l'immunité du chiot face au microbisme de l'élevage dans lequel il naît.

La placentation des carnivores domestiques est morphologiquement zonaire de type endothéliochorial : quatre couches cellulaires séparent le système vasculaire fœtal et maternel (figure 1). L'endothélium vasculaire maternel est en contact direct avec le chorion par l'intermédiaire de l'épithélium trophoblastique. Cet épithélium jouxte lui-même le

mésoderme extra-embryonnaire qui borde l'endothélium vasculaire foetal. L'endomètre et le mésenchyme utérin ont disparu (figure 1).

Ces 4 couches constituent une barrière efficace. En effet, le trophoblaste est une couche perméable aux petites molécules mais imperméable aux cellules. Elle limite donc le passage des agents infectieux, mais aussi celui des cellules immunitaires maternelles. Cette placentation permet le passage au foetus in utero de 5 à 10 % des concentrations en immunoglobulines (Ig) circulantes chez le chiot 2 jours après la naissance (Tizard 1982 ; Greene, 1984).

A la naissance, le chiot possède un système immunitaire compétent mais naïf et immature (Lewis et al., 1973). Il lui faudra encore environ 3 semaines pour être capable de produire des anticorps et se défendre par lui-même (Day, 2007). Durant la période néonatale et pédiatrique, ce sont les immunoglobulines maternelles transmises par voie orale (via les sécrétions mammaires) qui protégeront le chiot. Le chiot nouveau-né aurait une concentration sérique en IgG qui représenterait approximativement 5% du niveau adulte. En l'absence de prise de colostrum, on estime que le chiot sera probablement protégé pour au moins une semaine grâce au faible passage d'immunoglobulines in utero (Appel et Gillespie, 1972). On comprend donc le rôle essentiel du transfert passif de l'immunité dans le contrôle des maladies infectieuses et donc la maîtrise du taux de mortalité.

Chez le veau, l'ingestion d'une quantité adéquate d'immunoglobulines colostrales durant les vingt-quatre premières heures de vie réduit le risque de morbidité et de mortalité. Wittum et Perino (1995) ont même démontré que le risque de décès avant le sevrage est cinq fois plus élevé chez les veaux qui ont subi un transfert insuffisant de l'immunité passive que chez les veaux protégés (définis par un taux de protéines totales sériques supérieur à 4,8 g/dl). La masse d'immunoglobulines ingérée doit donc être suffisante pour protéger le veau des maladies pendant ses premiers mois de vie. La qualité immunologique du colostrum est donc essentielle dans la maîtrise de la mortalité, outre son rôle laxatif et nutritif.

Néanmoins, contrairement à celui d'autres espèces comme les bovins ou les porcins, le colostrum est méconnu dans l'espèce canine.

Après quelques rappels physiologiques sur le mécanisme de la lactation et la composition des sécrétions mammaires (colostrum/ lait), nous nous intéresserons à la description de notre étude. L'objectif du travail expérimental présenté dans ce manuscrit était de caractériser les sécrétions mammaires de la mise-bas à 2 mois post partum d'un point de vue immunologique. Il s'agissait également de corrélérer ces concentrations en immunoglobulines colostrales avec les taux d'immunoglobulines sériques de la mère durant cette période. L'influence de différents facteurs (taille, poids de la portée...) sur les concentrations en immunoglobulines a été étudiée. Enfin, après avoir discuté les résultats obtenus, nous présenterons les modalités de remplacement en cas d'absence du colostrum.

On utilisera l'abréviation « Ig » pour le terme immunoglobuline.

I) Les sécrétions mammaires

A. Phénomène de sécrétion : la lactation

1. Les glandes mammaires

La chienne possède généralement 5 paires de glandes mammaires, 2 sont dites thoraciques, 2 abdominales et 1 paire inguinale. Chaque glande est une unité fonctionnelle indépendante et peut allaiter de un à plusieurs petits, c'est une glande à sécrétion externe. Elle a une structure en grappe, un regroupement de lobe, constitué de lobules, ces lobules étant organisés en alvéoles. Ces alvéoles sont tapissées d'un épithélium tubulo-alvéolaire. Le drainage est effectué par des canalicules, puis des canaux lobulaires, lobaires et mammaires, pour déboucher au niveau d'un mamelon (figure 1).

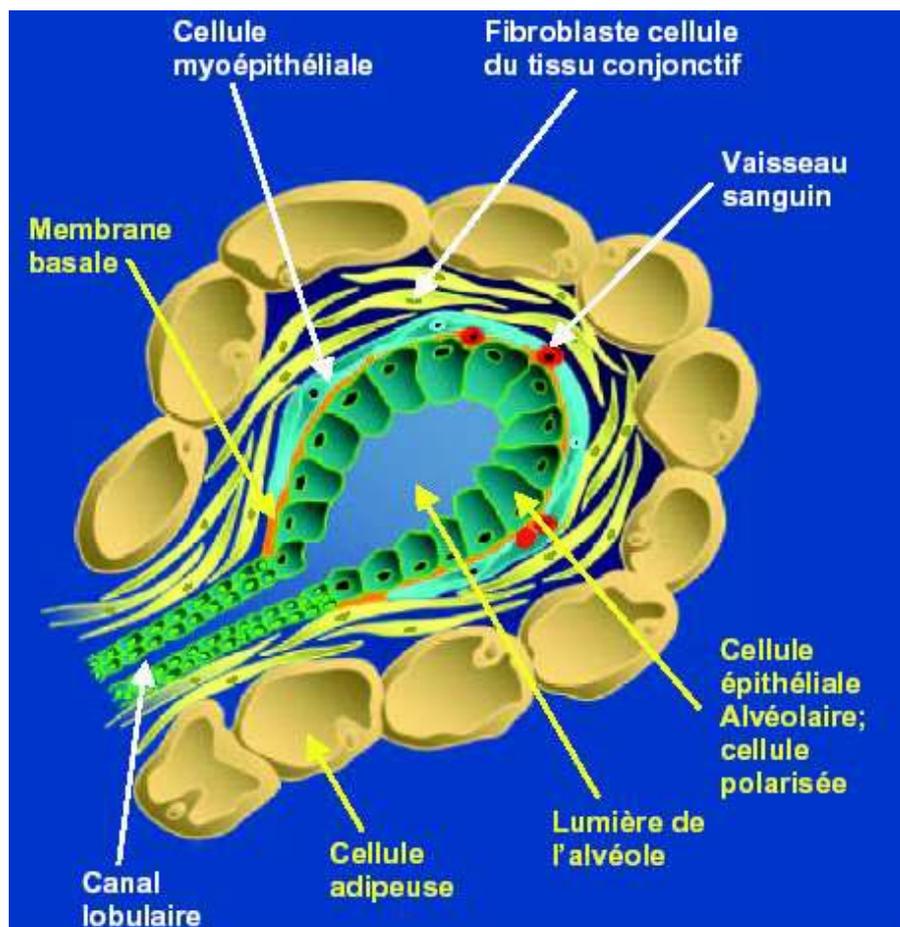


Figure 1 : Structure d'un acinus mammaire, d'après Gayrard (2007).

2. Mammogenèse

Chez la chienne, la mammogenèse se met en place à chaque cycle œstral par une croissance progressive qui est à son terme 40 à 50 jours après le pic de LH, en dioestrus (Gayraud, 2007). Cette croissance est sous contrôle de l'oestradiol et de la progestérone. Il est donc amplifié lors de la gestation. Après le 25^{ème} jour de gestation, la production lutéale de progestérone augmente grâce à l'augmentation de la concentration en prolactine, qui devient significativement plus élevée le 32^{ème} jour qu'au début de la gestation. Cette augmentation est concomitante avec l'apparition d'un pic de concentration en relaxine entre le 25^{ème} et le 27^{ème} de gestation. On suppose donc un lien entre prolactine et relaxine. Cette dernière, d'origine placentaire, apparaît en milieu de gestation, perdure toute la gestation et décline au moment du part (Concannon, 2009). La concentration sérique en oestradiol, en augmentation en fin de gestation, serait simplement le reflet d'une stimulation lutéale due à l'augmentation de la prolactine (figure 2).

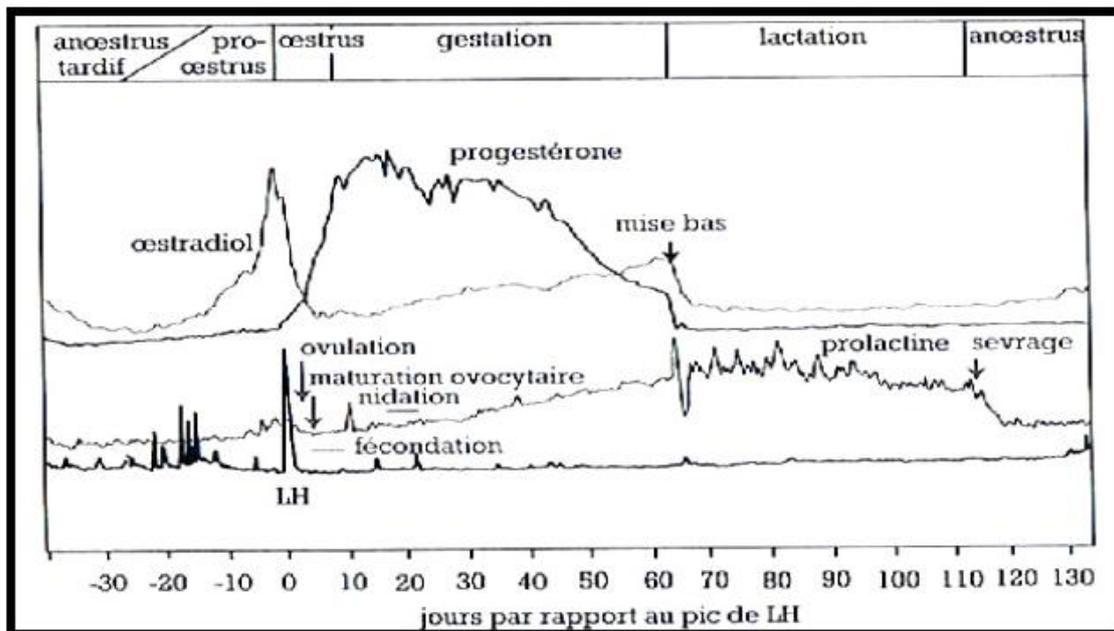


Figure 2 : Evolution hormonale (LH, progestérone et oestradiol) au cours du cycle sexuel chez la chienne gestante d'après Fontbonne et al. (2000)

L'oestradiol et la progestérone agissent directement au niveau des cellules épithéliales souches situées à l'extrémité des canaux mammaires. L'oestradiol agit par ses récepteurs qui sont constitutifs dans les cellules épithéliales mammaires souches pour augmenter les récepteurs de la progestérone. Les cellules épithéliales souches mammaires deviennent

alors capables de se multiplier sous l'effet de la prolactine et de certains facteurs de croissance. La progestérone limite l'augmentation du nombre de récepteurs de la prolactine et limite ainsi l'effet lactogène de la prolactine pendant la mammogenèse. Les œstrogènes ne sont pas directement responsables de la multiplication des cellules épithéliales mammaires du tissu normal mais de certaines tumeurs. Les hormones du métabolisme général, insuline et thyroxine, jouent un rôle dans le développement de la glande mammaire. Parmi les facteurs de croissance impliqués dans la différenciation de la glande mammaire, les IGF (insulin-like growth factor) et l'EGF (epidermal growth factor) jouent un rôle très important. Ajoutés dans le milieu de culture de tissus mammaires, l'IGFI stimule la synthèse d'ADN et l'EGF augmente la synthèse de collagène (Gayrard, 2007).

3. Colostrogenèse

Il est difficile de trouver des données concernant le mode de formation du colostrum dans l'espèce canine. En revanche, dans l'espèce porcine, on sait que le colostrum est produit par la mamelle à la fois par transsudation et par sécrétion, alors que le lait est produit uniquement par sécrétion (Bourne et Curtis, 1973).

D'une part, les jonctions serrées entre lactocytes ne sont pas encore fermées (Neville et al., 2001) permettant le passage para-cellulaire de cellules immunitaires, d'immunoglobulines et d'électrolytes de la circulation sanguine à la lumière des alvéoles (Klopfenstrein et al., 2002). D'autre part, l'organisation des organites des lactocytes ne montre pas encore leur spécialisation de cellules sécrétrices polarisées comme lors de la lactogenèse (Kensinger et al., 1986), et ce malgré des phénomènes de sécrétion : pinocytose inversée de minéraux et de glucides, exocytose de globules gras et passage transcellulaire d'Ig (Delouis et al., 2001 ; Klopfenstrein et al., 2002).

4. Déclenchement de la lactation

La lactation est déclenchée au moment de la parturition. La fin de la gestation se produit sous l'action d'un mécanisme foeto-placentaire. L'augmentation subite des concentrations en prostaglandines (PGF 2 α), 24 à 36 heures avant le part, engendre une diminution très rapide de la concentration en progestérone (en dessous de 1-2 ng/mL 8 à 12 heures avant le part) (figure 3).

L'augmentation simultanée du cortisol, certainement provenant des glandes surrénales foetales, suggère un rôle direct du cortisol sur le déclenchement du part, comme c'est le cas chez l'Homme et chez les ovins (Concannon, 2009).

De plus, la chute des concentrations en progestérone s'accompagne d'une augmentation de la concentration circulante en prolactine. Cette augmentation des taux de prolactine déclenche l'activité sécrétoire intra-alvéolaire des acini mammaires (Gayard, 2007).

Enfin, elle pourrait jouer un rôle dans le relarguage des prostaglandines et donc dans la progression du part, comme cela a déjà été prouvé chez le rat (Nephew et al., 2007).

5. Agalactie

L'agalactie est l'absence de production ou de sécrétion lactée. L'agalactie primaire, c'est-à-dire l'incapacité de produire du lait, est rarissime, et est liée à des anomalies anatomiques ou physiologiques.

L'agalactie secondaire peut survenir à la suite d'une alimentation inadéquate, d'un stress, d'une mise-bas prématurée, d'un traitement aux progestagènes, d'une mammites, d'une métrite, de troubles psychologiques, d'endotoxémie ou de maladie systémique.

Pour l'agalactie primaire, les traitements sont inefficaces si elle est due à des malformations anatomiques de la glande mammaire ou que cette dernière ne répond pas à une stimulation hormonale.

Pour traiter une agalactie secondaire, la cause prédisposante doit être gérée. Une jeune chienne ou une primipare peut être nerveuse et craintive de mettre bas. Pour l'aider, il est parfois utile de la rassurer ou de lui donner des tranquillisants (type phénothiaziniques qui favorisent à la sécrétion de prolactine). La sécrétion de prolactine peut aussi être stimulée par une injection de métoclopramide (Primpérid®, 0,5 à 1 mg/kg par voie sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse). Mais le problème peut être dû à un défaut d'éjection du lait. Les mamelles sont alors dures et enflées et le traitement consiste en l'administration de médicaments facilitant l'éjection, tels que l'ocytocine (2 UI 4 fois/jour jusqu'à amorçage de la sécrétion).

Toutes les causes d'agalactie ne sont pas identifiées ni identifiables. Les causes d'agalactie sont multiples et doivent être traitées en premier lieu pour que la production lactée soit relancée (Segalini, 2008).

6. Entretien de la lactation

A la naissance, la glande est fonctionnelle mais sa capacité de synthèse est très limitée. Elle acquiert ses capacités maximales de synthèse après la première tétée par hyperplasie des cellules épithéliales qui s'enrichissent en organites et atteignent leur capacité de synthèse maximale. La production laitière est nombre de cellules dépendante.

L'entretien de la production de lait se fait grâce à un réflexe neuro-hormonal dû à la succion des chiots. La tétée provoque la libération d'hormones hypothalamiques hypophysiotropes puis d'hormones hypophysaires, telles que la TSH (thyroid-stimulating hormon), l'ACTH (adrenocorticotropic hormon), qui augmentent le métabolisme général et la prolactine, qui agit sur les cellules épithéliales sécrétrices de la glande mammaire en favorisant la synthèse des protéines du lait. C'est aussi grâce à la succion que le réflexe d'éjection du lait se produit en agissant sur la libération d'hormones hypothalamo-neurohypophysaires, qui agissent sur les concentrations en ocytocine (Gayraud, 2007).

7. Sevrage

Le sevrage est le passage d'une alimentation exclusivement lactée à une alimentation solide. C'est une période primordiale de stress intense pour le chiot, qui s'effectue progressivement, puisque cela revient à séparer la mère du chiot.

Le sevrage du chiot se prépare de manière à stimuler les sécrétions digestives qui lui permettront de mieux digérer l'amidon, et à tolérer des régimes plus variés. En effet, la capacité à digérer l'amidon est acquise progressivement, grâce à l'augmentation de l'activité de l'amylase. Cette capacité devient significative après le sevrage, à partir de 9 semaines (Meyer, 1991).

Les chiots commencent à consommer des aliments non lactés dès 3 semaines, mais la quantité est plutôt symbolique pendant une à deux semaines. Ensuite, les chiots commencent à consommer les aliments de leur mère par imitation.

Entre 6 et 8 semaines, les chiots deviennent capables de consommer seuls une quantité significative de nourriture solide. Vers 7-8 semaines, les chiots sont séparés « physiquement » de leur mère pour achever leur sevrage et stopper la lactation.

En l'absence de chiot et du réflexe de succion, le tarissement se produit naturellement (Blanchard et Paragon, 2008).

Le moment du sevrage est bien entendu influencé par les techniques d'élevage et l'accès des chiots à la nourriture (Rüsse, 1961).

B. Composition des sécrétions mammaires

1. Colostrum

Le colostrum est la première des sécrétions de la glande mammaire produite dans les heures précédant et suivant la mise-bas. La composition des sécrétions mammaires se modifie rapidement pour devenir le « lait » entre 24 heures après la mise-bas et la fin de la première semaine de lactation, ceci n'est pas clairement défini dans l'espèce canine. Le colostrum est caractérisé par sa richesse en protéines, en immunoglobulines notamment, et sa faible teneur en glucides et lipides par rapport au lait (Klobasa et al., 1987). Les protéines et les nutriments du colostrum constituent l'assistance immunitaire principale du nouveau-né. Il fournit aussi de l'énergie au chiot (aide à la thermorégulation) et exerce un effet laxatif (Hand et al., 2000).

a. Protéines

a1. Immunoglobulines

Selon la définition de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), les immunoglobulines sont des glycoprotéines ayant une activité anticorps ou possédant une structure semblable à celle des anticorps. De façon générale, lorsqu'on parle d'anticorps (Ac), on fait référence à une fonction, ils font partie de la réponse immunitaire et sont capables de neutraliser des antigènes. Quand on parle d'immunoglobuline (Ig), on fait référence à une structure.

Ces immunoglobulines peuvent prendre différentes formes, mais possèdent une structure similaire avec l'association de deux chaînes polypeptidiques lourdes et légères.

Les 5 formes de chaîne lourde sont à l'origine du classement des immunoglobulines en 5 classes (G, M, E, A, D). La présence d'une Ig D canine n'étant pas clairement définie et son rôle inconnu, nous n'aborderons pas cette classe d'Ig dans notre étude. Chacune de ces chaînes lourdes peut être associée à deux types de chaîne légère (kappa et lambda). Les chaînes lourdes et légères sont associées entre elles par des ponts disulfures (figure 4). Les immunoglobulines possèdent deux sites de reconnaissance antigénique, appelés fragments Fab, qui permettront de lier les épitopes (motif porté par l'antigène, susceptible de se lier à une molécule de reconnaissance du système immunitaire). Le troisième fragment correspond au reste des chaînes lourdes, c'est le fragment Fc. De 50 000 Da, ce fragment active le système complémentaire et permet la fixation des Ac sur les cellules, assurant la fonction effectrice des immunoglobulines (Euzéby, 2008).

Quelque soit l'espèce animale, il n'y a qu'une seule origine cellulaire possible aux Ig, le plasmocyte, qui dérive des lymphocytes B précurseurs. Chaque cellule ne sécrète qu'une classe d'Ig et d'une seule spécificité antigénique (Euzéby, 2008).

a1 _ 1. Immunoglobuline G

Les immunoglobulines G représentent la classe d'immunoglobuline présente en plus forte concentration dans le sérum chez le chien, en moyenne 9,8 g/L d'après Heddle et Rowley (1975). Elle possède la capacité de diffuser très rapidement dans l'espace extravasculaire. Elle se présente en une unique unité d'immunoglobuline (2 chaînes lourdes associées à 2 chaînes légères), qui peut donc potentiellement neutraliser deux épitopes (figure 3). Son poids moléculaire est de 180 kDa. Chez le chien, il existe 4 sous classes d'Ig G (Ig G1- Ig G4). De par leur poids moléculaire et la barrière établie par le trophoblaste dans le placenta, les Ig G ne passent qu'en faible proportion la barrière placentaire, mais ceux sont les seules qui peuvent la traverser (Tizard, 2009).

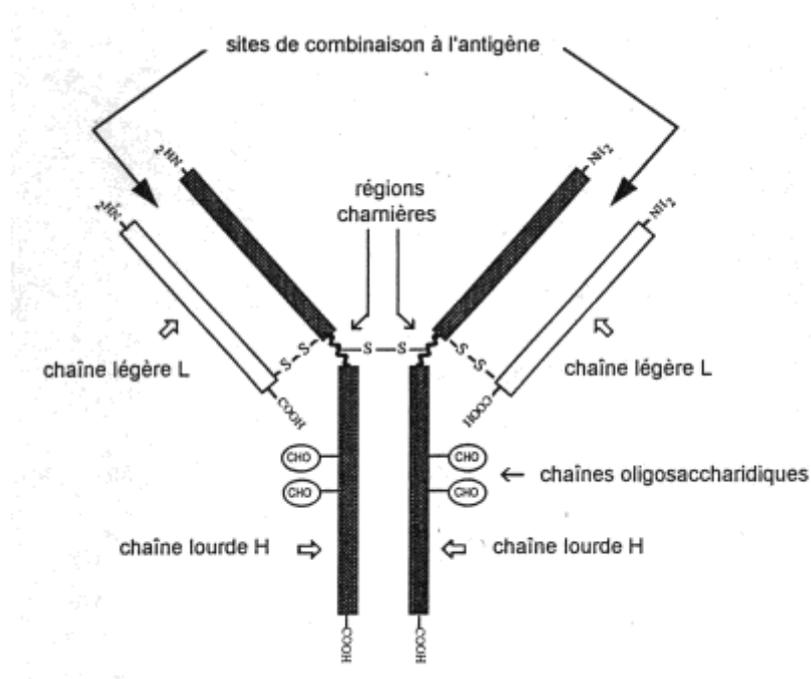


Figure 3 : Structure d'une immunoglobuline G, molécule prototype des immunoglobulines, d'après Tizard (2009)

a1-2. Immunoglobuline M

Les Ig M sont la deuxième classe d'immunoglobuline la plus représentée dans le sérum après les Ig G. Dans l'espèce canine, Heddle et Rowley (1975) ont établi une concentration sérique moyenne en Ig M de 1,7 g/L. Cette molécule est formée de 5 immunoglobulines basiques, reliées entre elles par une chaîne de jonction J. Donc une seule molécule d'Ig M possède 10 sites de reconnaissance antigénique (figure 4). Les Ig M sont les immunoglobulines majoritairement produites lors de réponse immunitaire primaire (Tizard, 2009). Elles sont aussi produites lors de réponse secondaire, mais cette synthèse est masquée par l'abondance des Ig G. Bien que produite en petites quantités, l'Ig M est plus efficace que l'Ig G pour l'activation du complément, l'opsonisation, la neutralisation des virus, et l'agglutination.

En revanche, vu leur taille (leur poids moléculaire total est en effet de 900 kDa), les immunoglobulines M ne peuvent rarement sortir de la circulation sanguine pour atteindre les sites d'inflammation aiguë, et donc en particulier, ne peuvent pas traverser le placenta (Tizard, 2009).

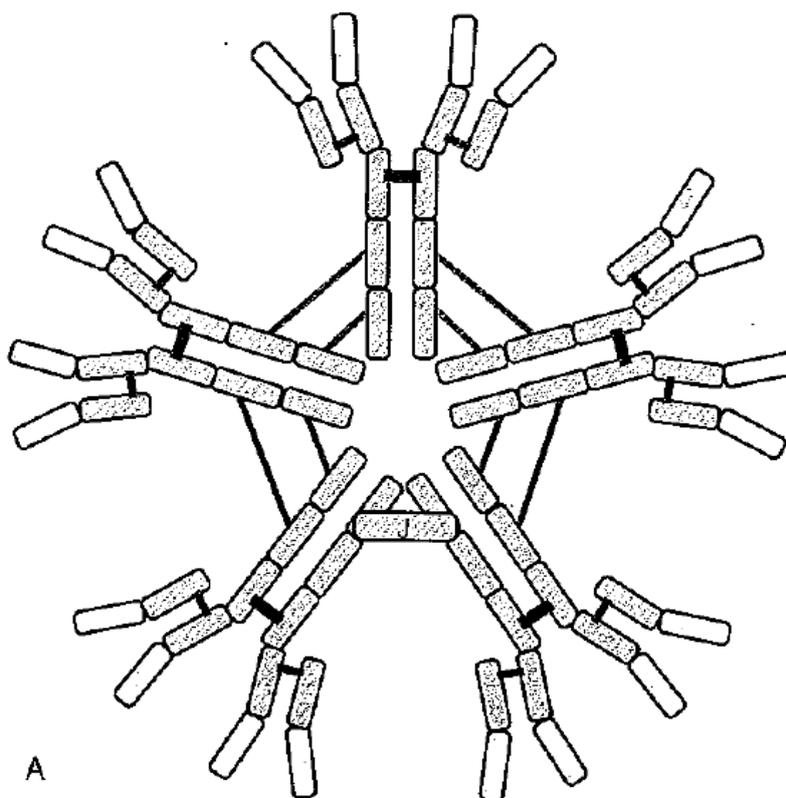


Figure 4 : Structure d'une immunoglobuline M (5 immunoglobulines reliées par la chaîne J), d'après Tizard (2009).

a1_3. Immunoglobuline A

Les immunoglobulines A peuvent être trouvées sous forme de monomère (une unique molécule d'immunoglobuline, avec deux sites de reconnaissance antigénique) ou de dimère (avec une chaîne de jonction J et 4 sites de reconnaissance épitopiques) (figure 5).

Les Ig A sont souvent produites au niveau des muqueuses et chez le chien, la forme dimérique est la plus représentée que ce soit dans le sérum ou au niveau des muqueuses.

La fabrication a lieu dans les parois de l'intestin, de l'appareil respiratoire, du système urinaire, de la peau et des glandes mammaires. Comme cette immunoglobuline est présente sous la même forme dans le sérum et au sein des muqueuses, le taux sérologique mesuré pourrait être un bon indicateur de la concentration à la surface des muqueuses. Cependant, une pièce sécrétoire se lie à cette molécule en traversant l'épithélium mucosal (du lieu de fabrication aux sécrétions externes) et la protège des dégradations enzymatiques (figure 6). Les concentrations sériques, 0.5 g/L en moyenne chez le chien (Heddle et Rowley, 1975), sous-estimeraient donc la réelle concentration des Ig A dans les sécrétions externes. Les immunoglobulines A sont même les principales immunoglobulines des sécrétions externes chez les chiens. Son importance est donc capitale dans la protection des muqueuses citées précédemment (Day, 1999).

Généralement, les Ig A ne peuvent ni opsoniser, ni activer le complément. Elles peuvent cependant agglutiner des antigènes et neutraliser des virus. Ils préviennent donc l'adhérence de microbes aux surfaces du corps, et en particulier aux muqueuses.

Tout comme les immunoglobulines M, cette molécule de taille importante ne peut traverser la barrière placentaire (Tizard, 2009).

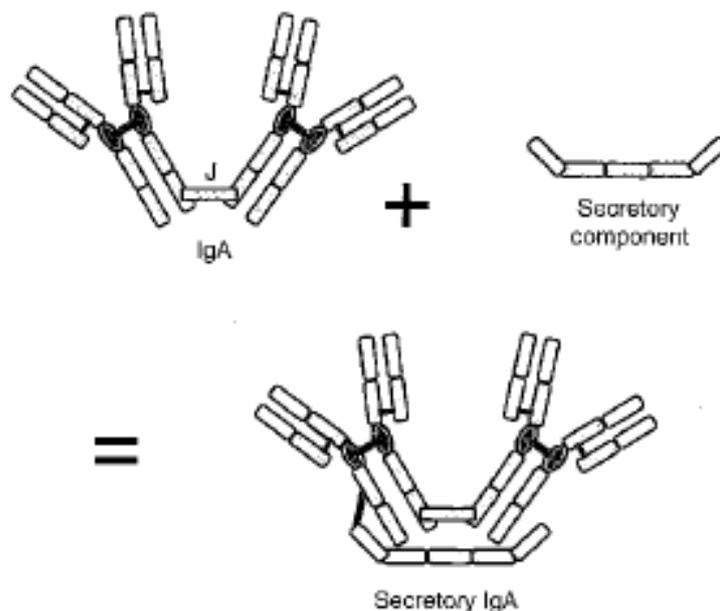


Figure 5 : Structure d'une immunoglobuline A et d'une Ig A sécrétoire, d'après Tizard (2009).

a2. Autres composants protéiques

Le taux protéique augmente tout au long de la lactation, passant de 4,3% dans les 2 premiers jours à environ 7% dans le lait au sevrage (Bebiak et al., 1987). Il y a donc moins de protéines dans le colostrum que dans le lait. En revanche, d'après Hand et al (2000), le taux de protéines diminue rapidement dans les 12 à 24 heures après la mise-bas, provoquant une diminution du taux de matière sèche. Les immunoglobulines citées précédemment représentent 50% des protéines colostrales (mais les proportions de caséines et d'Ig ne sont pas précisées). La caséine, qui représente 61% des protéines du colostrum, voit sa proportion augmenter jusqu'à 75.4% au 3^{ème} jour de la lactation, puis diminue lentement. Sa concentration est relativement stable (Adkins et al, 2001).

Le taux d'albumine est plus élevé dans le colostrum (20,5 g/L au premier jour de sécrétion) que dans le lait (19,3 g/L 3 jours post mise-bas) (Schafer et al, 2005).

La fraction d'azote protéique représente 5.7% dans le colostrum, et jusqu'à 9.9% dans le lait.

Les sécrétions mammaires contiennent par ailleurs des acides aminés, leurs concentrations variant énormément selon le moment de la lactation. Les plus grandes variations se font entre le premier et le troisième jour de lactation avec une nette diminution. Par exemple, l'alanine passe de 0,170 à 0,052 mM/L entre le premier et le troisième jour post mise-bas. Ces concentrations augmentent ensuite au cours de la lactation jusqu'au 21^{ème} jour de lactation, sans atteindre de nouveau la valeur initiale de leur concentration dans le colostrum (à J21, la concentration en alanine est de 0,082 mM/L). Après le 21^{ème} jour, chaque acide aminé évolue de manière isolée (Adkins et al, 2001).

b. Lipides

Le taux de lipides est fonction du stade de lactation. Il augmente au début de la lactation puis varie différemment selon les auteurs au cours du reste de la lactation (Segalini, 2007). Le taux passe de 2,4% les deux premiers jours, à 5,2% dans le lait (après le 4^{ème} jour de lactation jusqu'au sevrage) pour finir à 2,7% au sevrage (Bebiak et al., 1987).

c. Lactose

Le taux de lactose est initialement faible dans le colostrum, 10 g/L, par rapport à celui du lait mature (après le 4^{ème} jour de lactation jusqu'au sevrage), 33g/L. Il augmente jusqu'au 28^{ème} jour pour atteindre 40.2g/L dans le lait. La concentration va ensuite diminuer pour rester constante à 35g/L pendant le reste de la lactation (Hands et al, 2000).

d. Minéraux et vitamines

Le colostrum est plus riche que le lait en matières minérales (Le Berre, 1996). Les résultats sont assez variables mais on note de fortes concentrations de calcium (transporté par les caséines), de phosphore, de cuivre et de fer. Pour le fer, il est important de noter que le chien est capable de sécréter un colostrum et un lait très riches en fer, cette concentration étant bien supérieure que celle obtenue dans les autres espèces. En effet, le lait de chienne peut présenter des concentrations en fer 10 fois supérieures à celle du sérum (Lonnerdal et al, 1981). Cela indique l'existence de phénomènes de transport actif.

D'autres minéraux sont également présents tels que le zinc, le manganèse et le magnésium. De plus, le colostrum est aussi riche en vitamines (A, B1, B2, C), vitamines nécessaires au nouveau-né (Le Berre, 1996). Le taux élevé de vitamine A dans le colostrum permet d'augmenter de 25% les réserves hépatiques des chiots (Hands et al., 2000).

e. Éléments cellulaires

Hormis les immunoglobulines, d'autres facteurs de protection sont présents dans le lait et le colostrum. Des composants cellulaires tels que des lymphocytes et des cellules phagocytaires, des neutrophiles et des macrophages (Stokes et Bourne, 1989). Ces cellules sont absorbées par le nouveau-né et contribuent à l'établissement d'une immunité locale à médiation cellulaire. Ces cellules phagocytaires ont aussi un rôle dans le relargage d'IgA en réponse à des pathogènes entériques (Slade et Schwartz, 1987). D'autres protéines présentes dans les sécrétions mammaires ont un rôle dans la protection précoce du nouveau-né. Par exemple, Rainard (1987) a montré que la lactoferrine du lait de vache avait une activité bactériostatique. Le lait contient aussi des facteurs de croissance qui participeraient au maintien de l'intégrité de la barrière muqueuse (Carpenter, 1980).

f. Antitrypsines

Les immunoglobulines maternelles échappent au processus de digestion des protides, du fait de l'immaturité relative des processus enzymatiques du nouveau-né, mais aussi parce que le colostrum lui-même contient des inhibiteurs de la trypsine (Arnaud, 2004).

Ces inhibiteurs de la trypsine protègent les Ig G colostrales de la dégradation protéolytique, ce qui contribue à une plus grande absorption intestinale (Crawford et al, 2003).

g. Autres

Les sécrétions mammaires sont aussi riches en Insulin-like Growth Factors (IGF), en hormone de croissance (GH) et en certaines enzymes comme les phosphatases alcalines (PAL) ou γ glutamyltransférase (γ GT). Les facteurs de croissance et les hormones présents dans le colostrum jouent un rôle crucial dans le développement et la santé des jeunes animaux, en particulier la maturation du tube digestif (White, 1996 et Center et al., 1991).

On peut relever que notamment ces facteurs de croissance favorisent chez le chiot l'acquisition, le développement et l'évolution de l'équipement enzymatique de la muqueuse intestinale

Les rôles physiologiques du colostrum sont donc multiples et indispensables à la bonne croissance du chiot. Mais si les sécrétions mammaires sont nécessaires, elles peuvent contenir aussi des agents pathogènes ou des médicaments. Il est donc important de porter une attention particulière lors des traitements de la chienne en lactation.

h. Evolution de la composition des sécrétions mammaires pendant la lactation.

Le colostrum est caractérisé par sa richesse en protéines et sa faible teneur en lipides et en glucides par rapport au lait. Sa composition évolue très rapidement vers celle du lait, moins riche en protéines mais source importante de lipides et lactose (tableau 1).

Nutriments	Jours de lactation							
	1	3	7	14	21	28	35	42
Protéines (g/l)	143	102,3	81,7	66,8	68,4	85,5	82,9	96,4
Lipides (g/l)	132,2	137,2	132,1	118,5	112,5	113,6	131,2	133,7
Lactose (g/l)	16,6	29,3	35,4	39,9	39,4	40,2	34	35,4
Calcium (Ca) (mg/l)	1 363	1 366	1 773	1 950	1 929	2 085	2 440	2 192
Phosphore (P) (mg/l)	935	914	1 166	1 175	1 359	1 401	1 364	1 355
Ca/P	1,5	1,5	1,5	1,7	1,4	1,5	1,8	1,6
Énergie (kcal/l)	1 831	1 761	1 657	1 493	1 444	1 525	1 648	1 731

Tableau 1 : Concentration moyenne en nutriments des sécrétions mammaires au cours de la lactation chez 10 chiennes Beagle, d'après Adkins et al. (2001)

Le colostrum est une source essentielle d'immunoglobulines pour le chiot. Or nous ne savons pas quelle quantité d'Ig compose le colostrum canin, quelles sont les classes d'Ig les plus représentées, et comment évoluent leur concentration et leur proportion au cours de la lactation. C'est dans ce cadre que nous nous intéressons à la qualité immunologique des sécrétions mammaires, ainsi qu'à leurs facteurs de variation.

II) Etude expérimentale

A. Matériels et méthodes

1. Animaux

L'étude a été conduite sur 10 chiennes de race Beagle. La parité des chiennes est inconnue. L'âge moyen des chiennes est de $36 \pm 4,1$ mois (12-53 mois).

Elles vivaient dans le même environnement au chenil du laboratoire de Biologie de la Reproduction (UMR 1198 INRA/ENVA Biologie du Développement et Reproduction). Elles avaient entre 1 et 4 ans et demi.

Les chiennes bénéficiaient un protocole vaccinal classique contre la maladie de carré, la parvovirose, l'hépatite de Rubarth, la leptospirose.

Les chiennes ont toutes été vaccinées contre l'herpès virus. Le vaccin EURICAN Herpès 250 (Merial, Lyon, France) a été administré le jour de la saillie et 1 mois avant la mise-bas.

Le moment de l'ovulation a été déterminé par frottis vaginal, dosage de la progestérone et échographie transabdominale (Reynaud et al, 2005). Deux et trois jours après l'ovulation, une insémination intra-vaginale a été réalisée avec de la semence issue d'un mâle Beagle de la même colonie de fertilité connue et bonne. Une césarienne était réalisée 61 jours post ovulation. Les chiots ont ensuite été laissés avec leur mère, avec accès libre aux mamelles.

2. Prélèvements

Les sécrétions mammaires et le sang des chiennes ont été prélevés à J0 (jour de la césarienne), J1, J2, puis tous les 7 jours jusqu'à J56 post partum (J7, J14, J21, J28, J35, J42, J49, J56 soit 8 semaines post partum).

De plus, les sécrétions mammaires d'une seule chienne ont été prélevées de J-6, six jours avant la mise-bas à J-1, veille de la mise-bas. Ces valeurs, ne concernant qu'une chienne, n'ont aucune valeur statistique et ne seront donc présentées qu'à titre indicatif.

On désignera les sécrétions mammaires collectées entre J0 et J2 par le terme « colostrum ». Ensuite, elles seront désignées sous le terme de « lait ».

a. Sécrétions mammaires

Pour faciliter la traite, de l'ocytocine (4UI par voie intramusculaire, Ocytocyne-S Intervet-Schering Plough, Beaucauzé, France) a été injectée. Après 3 minutes d'attente, le colostrum/lait de chaque paire de mamelle a été collecté et congelé à -80°C.

Les paires de mamelle étaient numérotées de la façon suivante :

M1 = paire de mamelle thoracique crâniale

M2 = paire de mamelle thoracique caudale

M3 = paire de mamelle abdominale crâniale

M4= paire de mamelle abdominale caudale

M5= paire de mamelle inguinale.

b. Sérum

Le sang a été prélevé sur tube sec à la veine jugulaire ou la veine céphalique. Les échantillons ont été laissés 1h puis placés une nuit à 4°C. Les prélèvements étaient ensuite centrifugés, puis le surnageant a été congelé à -80°C.

3. Dosage des immunoglobulines

Le dosage des immunoglobulines G, M et A est réalisé grâce à la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Chaque classe d'immunoglobuline a été dosée séparément. Chaque prélèvement a été dosé en duplicate.

a. Principe

La technique ELISA est un test immunoenzymatique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique. Dans la technique de dosage dite « en sandwich », les puits d'une microplaque sont tapissés avec un anticorps dit « de capture » capable de lier spécifiquement l'antigène recherché. Lors de cette opération appelée « coating », l'anticorps de capture se fixe au plastique des puits par des interactions électrostatiques.

Après lavage et saturation de la plaque, la solution à tester est déposée dans les puits de la microplaque et si l'antigène recherché est présent, il va se lier spécifiquement à l'anticorps de capture. Un deuxième anticorps couplé à une enzyme de révélation comme la peroxydase, capable de se lier à l'antigène capturé est alors ajouté dans le puits et les anticorps de révélation non fixés sont éliminés par lavage.

La réaction peut être quantifiée par colorimétrie à partir d'une courbe étalon, réalisée avec des concentrations connues d'antigène puisque le nombre de molécules d'anticorps de

révélation fixées dépend du nombre de molécules d'antigènes immobilisées par l'anticorps de capture.

b. Protocole

Notre protocole suit donc le principe de la technique ELISA.

○ Coating

Le coating est réalisé avec un anticorps polyclonal purifié spécifique de la classe d'immunoglobuline canine recherchée (tableau 2). Il est utilisé à une concentration de 0,01 mg/mL et sous un volume de 100 µL par puits. L'anticorps est dilué dans une solution de carbonate-bicarbonate (référence : Bethyl® C3041) à 0,05M pH 9,6. On incube ensuite la plaque à 30°C durant 1 heure.

	Anticorps	Références chez Bethyl®	Animal	Type	Couplage	[C]	Dilution de travail	Concentration finale
Coating	Anti dog IgG	A40-118A	Mouton	Polyclonal purifié	-	1 mg/mL	1/100	10 µg/mL
	Anti dog IgM	A40-116A	Chèvre	Polyclonal purifié	-	1 mg/mL	1/100	10 µg/mL
	Anti dog IgA	A40-104A	Chèvre	Polyclonal purifié	-	1 mg/mL	1/100	10 µg/mL
Révélation	Anti dog IgG - HRP	A40-118P	Mouton	monoclonal	Peroxydase	1 mg/mL	1/50 000	20 ng/mL
	Anti dog IgM - HRP	A40-116P	Chèvre	monoclonal	Peroxydase	1 mg/mL	1/100 000	10 ng/mL
	Anti dog IgA - HRP	A40-104P	Chèvre	monoclonal	Peroxydase	1 mg/mL	1/50 000	20 ng/mL

Tableau 2 : Anticorps de coating et de révélation

○ Lavages

On vide la plaque. On réalise 3 lavages avec 200 µL de PBS-Tween 20 à 0,05% (pH 8) (référence : Bethyl® T9039).

○ Saturation

On sature la plaque avec 200 µL par puits de PBS-BSA 1 % (pH 8) (référence : Bethyl® T6789). L'incubation dure 30 minutes à 30°C.

○ Lavages

On vide la plaque. On réalise 3 lavages avec 200 µL de PBS-Tween 20 à 0,05% (pH 8) (référence : Bethyl® T9039).

- Dilution des échantillons et dépôts

La gamme et les échantillons sont préalablement dilués dans du PBS-BSA 1 % et 0,05% Tween 20 (tableau 3 et 4). La gamme et les échantillons sont déposés dans les puits sous un volume de 100 µL. L'incubation dure 1 heure à 30°C.

ELISA	Concentration sérum étalon	Concentration de la gamme étalon
Ig G	31 mg/mL	De 500 à 7,8 ng/mL
Ig A	1,5 mg/mL	De 1000 à 15,625 ng/mL
Ig M	2,5 mg/mL	De 1000 à 15,625 ng/mL

Tableau 3 : Dilution des gammes

Type	Jours après mise-bas	Dilutions Ig A	Dilutions Ig M	Dilutions Ig G
Colostrum/lait	J 0 à J+2	1/50000 et 1/100000	1/2500 et 1/5000	1/50000 et 1/100000
Colostrum/lait	J+7 à J+14	1/50000 et 1/100000	1/2500 et 1/5000	1/25000 et 1/50000
Colostrum/lait	J+21 à J+56	1/50000 et 1/100000	1/2500 et 1/5000	1/10000 et 1/25000
Sérum chienne	J 0 à J+56	1/8000 et 1/16000	1/32000 et 1/64000	1/100000 et 1/200000

Tableau 4 : Dilution des échantillons

- Lavages

On vide la plaque. On réalise 5 lavages avec 200 µL de PBS-Tween 20 à 0,05% (pH 8) (référence : Bethyl® T9039).

- Anticorps de révélation

L'anticorps monoclonal de révélation couplé à l'HRP (horseradish peroxidase) est dilué dans du PBS-BSA 1 % et 0,05% Tween 20 (tableau 1). 100 µL sont ensuite déposés dans tous les puits. L'incubation dure 1 heure à 30°C.

- Lavages

On vide la plaque. On réalise 5 lavages avec 200 µL de PBS-Tween 20 à 0,05% (pH 8) (référence : Bethyl® T9039).

- Révélation

On dépose 100 µL de TMB (substrat de la peroxydase, référence : Bethyl® 080831). La durée de la révélation est fonction de la classe d'immunoglobuline dosée : 8, 12 et 8 minutes pour les Ig G, A, M respectivement.

- Arrêt de la révélation

On ajoute 100 μL d'acide sulfurique H_2SO_4 2M (référence : KPL® 50-85-04).

- Lecture

La lecture de l'absorbance se fait à l'aide d'un spectrophotomètre avec un laser émettant une longueur d'onde de 450 nm.

4. Analyse statistique

Pour chaque échantillon, et pour chaque classe d'immunoglobuline, la concentration en immunoglobuline a été déterminée en calculant la moyenne des deux valeurs issues des 2 replicates.

Ensuite, on obtient la concentration en immunoglobuline totale en faisant la somme des concentrations des trois classes d'immunoglobulines (Ig G, M, A).

Les résultats sont exprimées sous la forme moyenne \pm SEM (standard error of the mean), qui représente l'erreur type de la moyenne ($\text{SEM} = \sigma/\sqrt{n}$), σ étant l'écart-type et n le nombre d'échantillons de la population).

Des tests statistiques ont ensuite été menés grâce tout d'abord à l'analyse de la variance puis au test de Student.

L'analyse de la variance a permis d'étudier le comportement de la concentration en Ig, la variable continue à expliquer en fonction des individus et du temps. Ensuite, avec le test de Student, on compare deux groupes de données. On émet l'hypothèse nulle H_0 que ces deux groupes sont égaux, et on calcule la probabilité de faire une conclusion erronée (accepter H_0 alors que c'est faux ou rejeter H_0 alors qu'elle est vraie). On ne conclut que lorsque $p < 0,05$, dans ce cas les résultats sont considérés comme significativement différents.

Pour évaluer la corrélation entre deux variables aléatoires, nous avons calculé le coefficient de corrélation linéaire r . Nous avons conclu à une corrélation significative entre les variables lorsque $-1 < r < -0,5$ et $0,5 < r < 1$.

B. Résultats

1. Sécrétions mammaires

a. Population étudiée

10 mises-bas ont été prises en compte entre le 12 février 2006 et le 12 août 2008.

64 chiots sont nés, soit $6,4 \pm 0,35$ par portée (minimum 2, maximum 11). Le poids moyen des chiots était de $263 \pm 8,4g$. 7 chiots sont morts durant l'étude, soit un taux de mortalité de 12,3%.

b. Influence du numéro de la paire de mamelles

La variation de la concentration en immunoglobulines selon le numéro de paire de mamelles a été testée sur les sécrétions mammaires collectées entre J0 et J2, sur 13 échantillons. Les trois classes d'Ig ont été dosées (figure 6).

Les concentrations en immunoglobulines des trois classes sont équivalentes entre les différentes mamelles ($p=0,68$). Dans la suite de l'analyse, la concentration d'une immunoglobuline donnée à une date t est définie comme la moyenne des concentrations en Ig de cette classe dans les sécrétions des cinq paires de mamelles à cette date. Il sera fait de la même manière pour toutes les immunoglobulines mesurées.

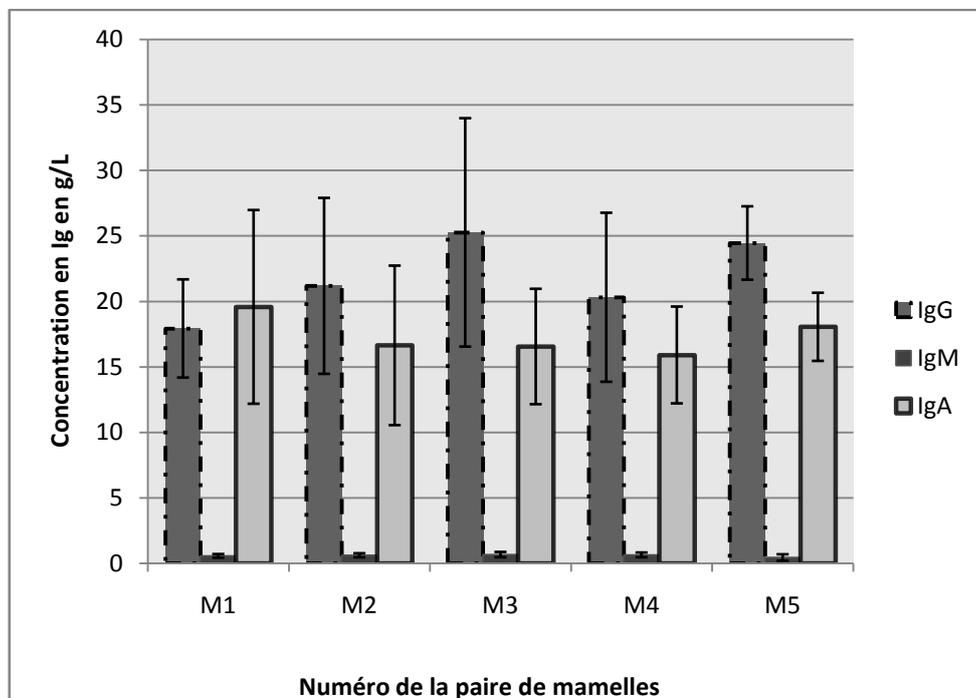


Figure 6 : Concentration des immunoglobulines dans la sécrétion lactée entre J0 et J2 en fonction du numéro de paire de mamelles (n = 13)

c. Cinétique de la concentration en Ig au cours de la lactation

c1. Ig G

La concentration en Ig G est significativement plus élevée de J0 à J2 qu'au cours de la suite de la lactation (concentration en Ig G significativement différente entre J2 et J7 avec $p=0,01$). La concentration en Ig G dans le colostrum est en moyenne de $17,9 \pm 2,7$ g/L ($n=14$), il n'y a pas de différence significative entre J0 et J2 ($p=0,07$).

Les concentrations après J7 et jusqu'à la fin de la lactation sont statistiquement stables, la concentration moyenne étant $1,36 \pm 0,3$ g/L ($n=43$) (figure 7).

Ensuite, on voit une très forte hétérogénéité de la concentration en Ig G dans le colostrum selon les chiennes. Par exemple à J0, la concentration minimale en Ig G est de 11,9 g/L alors que la valeur maximale est de 33,8 g/L.

Cette hétérogénéité s'efface au cours de la lactation, par exemple à J28, le minimum est de 0,28 g/L et le maximum 1,06 g/L.

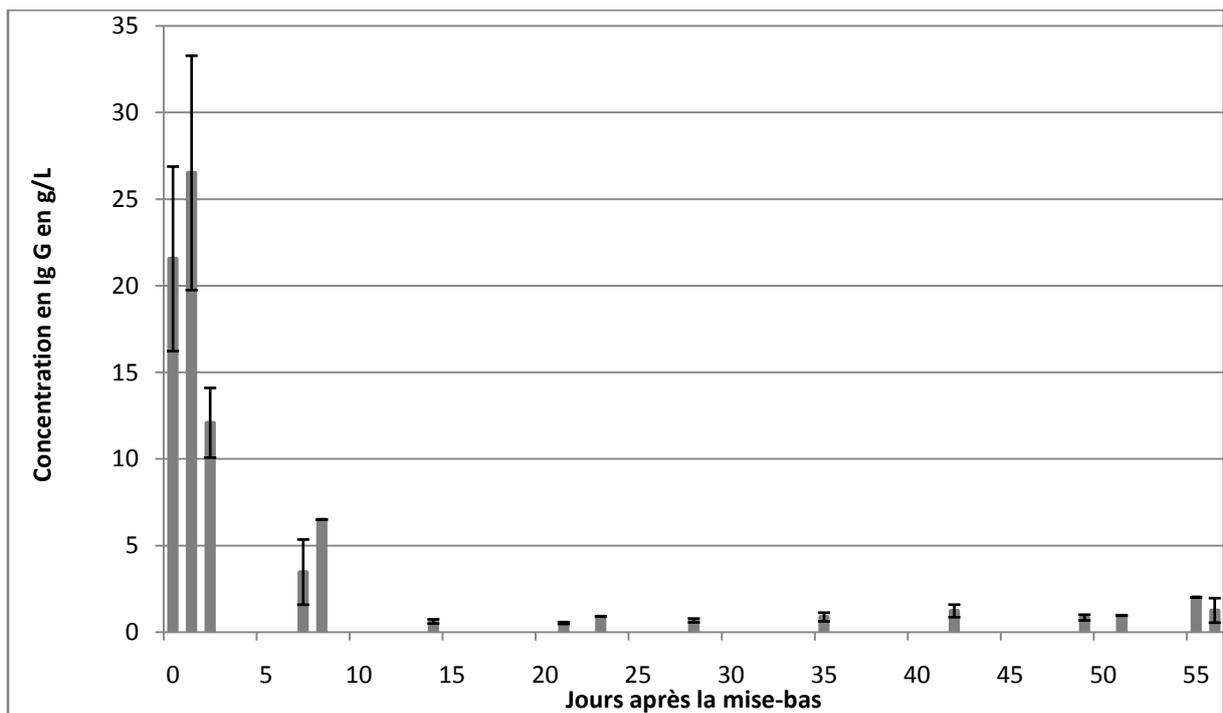


Figure 7 : Evolution de la concentration en Ig G dans les sécrétions mammaires au cours de la lactation

c2. Ig M

Les taux d'Ig M sont beaucoup plus faibles que les concentrations d'Ig G. Par exemple, dans le colostrum, le taux moyen d'Ig M est de $0,6 \pm 0,08$ g/L, alors qu'il est de $17,9 \pm 2,7$ g/L pour les Ig G (n=14). Les variations observées dans le temps ne sont pas significatives. La concentration moyenne en Ig M est $0,6 \pm 0,08$ g/L durant la lactation (n=57)(figure 8).

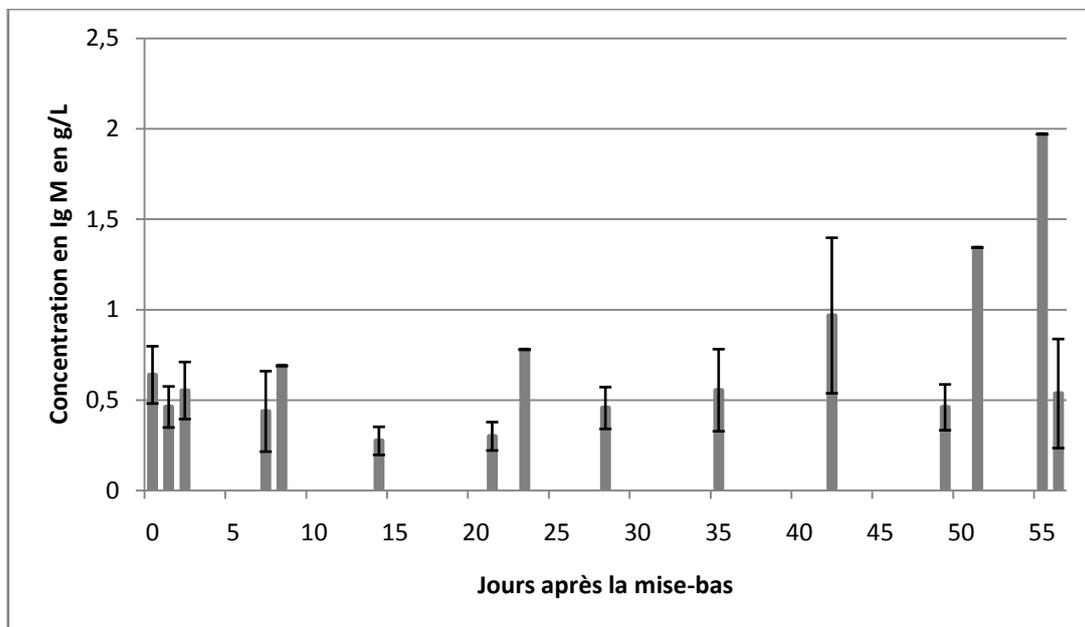


Figure 8 : Evolution de la concentration en Ig M dans les sécrétions mammaires au cours de la lactation

c3. Ig A

Les concentrations en Ig A sont élevées durant toute la lactation. Il n'y a pas de différence statistiquement significative au cours de la lactation (figure 9).

La concentration en Ig A dans le colostrum est de $13,3 \pm 1,9$ g/L (n=14). A partir de J2 (exclu) et jusqu'à la fin de la lactation, la concentration moyenne en Ig A est de $11,2 \pm 1,3$ g/l (n=43).

On peut remarquer 2 pics notables, à 42 et 55 jours post partum. On pourrait penser à des variations individuelles certainement mettant en jeu une réponse immunitaire locale, même si cela survient sur 2 chiennes différentes.

En excluant ces deux valeurs que l'on peut considérer comme exceptionnelles, la concentration en Ig A de J2 (exclu) jusqu'à la fin de la lactation est de 9,6 g/L. Même en excluant ces deux valeurs, il n'y pas de différence significative de la concentration en Ig A durant toute la lactation (p=0,6).

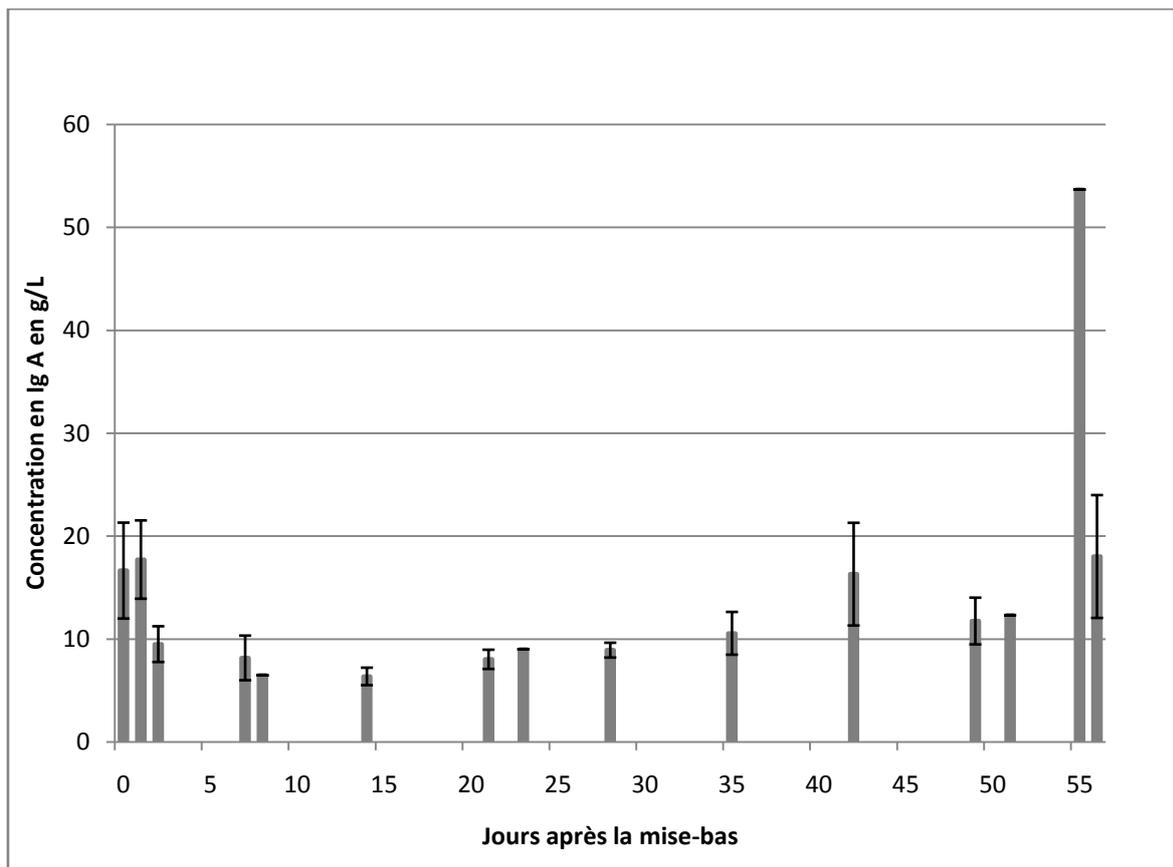


Figure 9 : Evolution de la concentration en Ig A dans les sécrétions mammaires au cours de la lactation

c4. Importance relative des différentes classes d'Ig

La concentration totale en immunoglobulines est directement corrélée à celle en immunoglobulines G durant les 10 premiers jours post partum, puis par la suite est calquée sur celle en immunoglobulines A (figure 10).

La concentration totale moyenne en immunoglobulines dans le colostrum est d'environ 43g/L dans notre étude et reste aux alentours de 10g/L tout au long de la lactation.

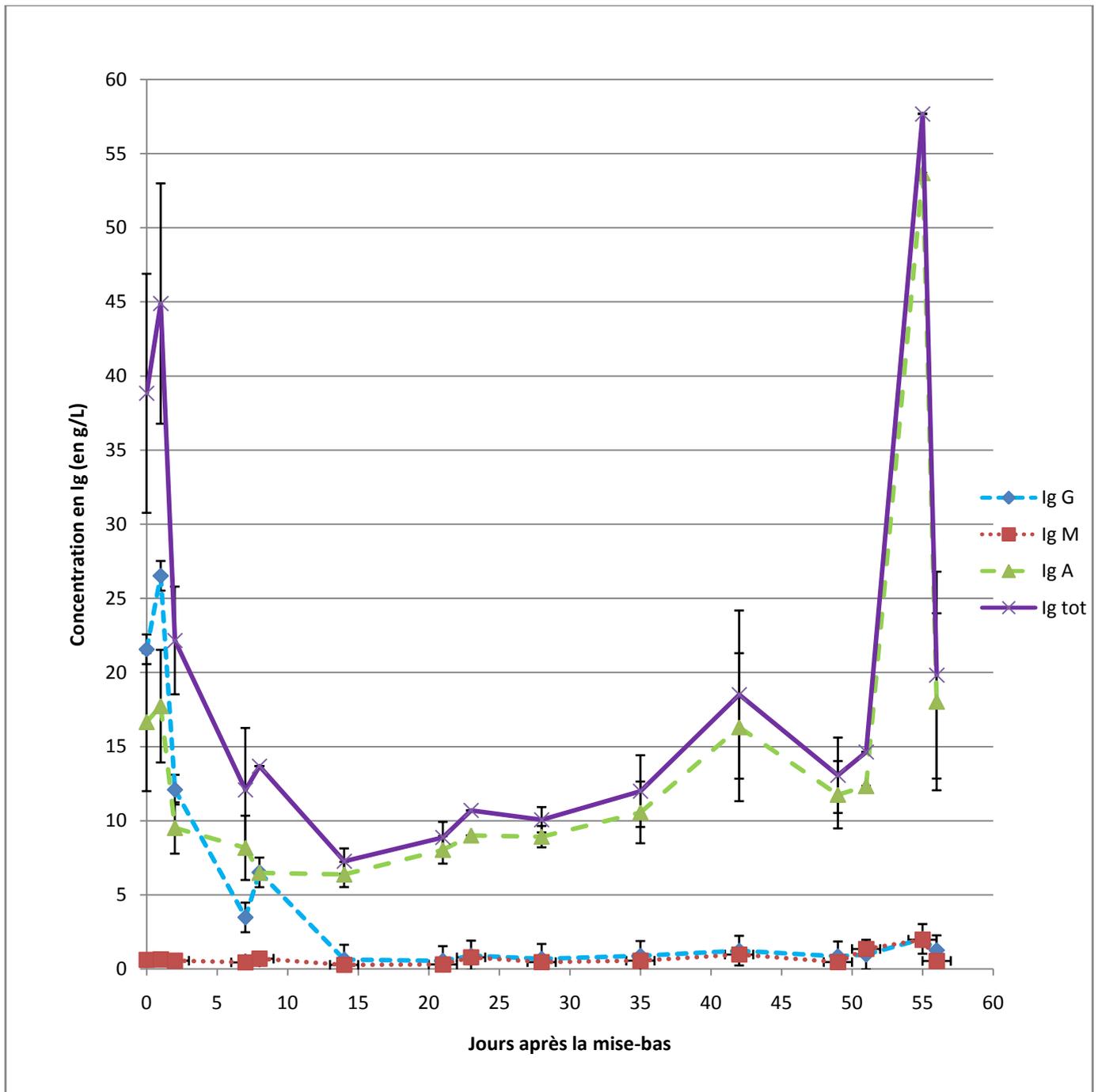


Figure 10 : Evolution des concentrations en immunoglobulines au cours de la lactation chez la chienne

La figure 10 montre des variations inter-individuelles majeures entre les chiennes. Par exemple, à J0, les concentrations en immunoglobulines totales varient de 20,7 à 56,9 g/L, soit une variation d'un facteur 2,5. La variation maximale est à J2, où le facteur de variation atteint 7,8.

c5. Importance relative des différentes classes d'Ig

La figure 11 montre l'évolution des proportions relatives en immunoglobulines dans les sécrétions mammaires. Alors que dans les 10 premiers jours, la proportion des immunoglobulines G diminue considérablement, celle des Ig A augmente. A la mise-bas, le colostrum contient 42% d'Ig A, 56% d'Ig G, la part des Ig M pouvant être considérée comme marginale, aux alentours de 2% des immunoglobulines totales. Quinze jours post partum, 90% des immunoglobulines des sécrétions mammaires sont des Ig A, environ 7% sont des Ig G et 3% des Ig M.

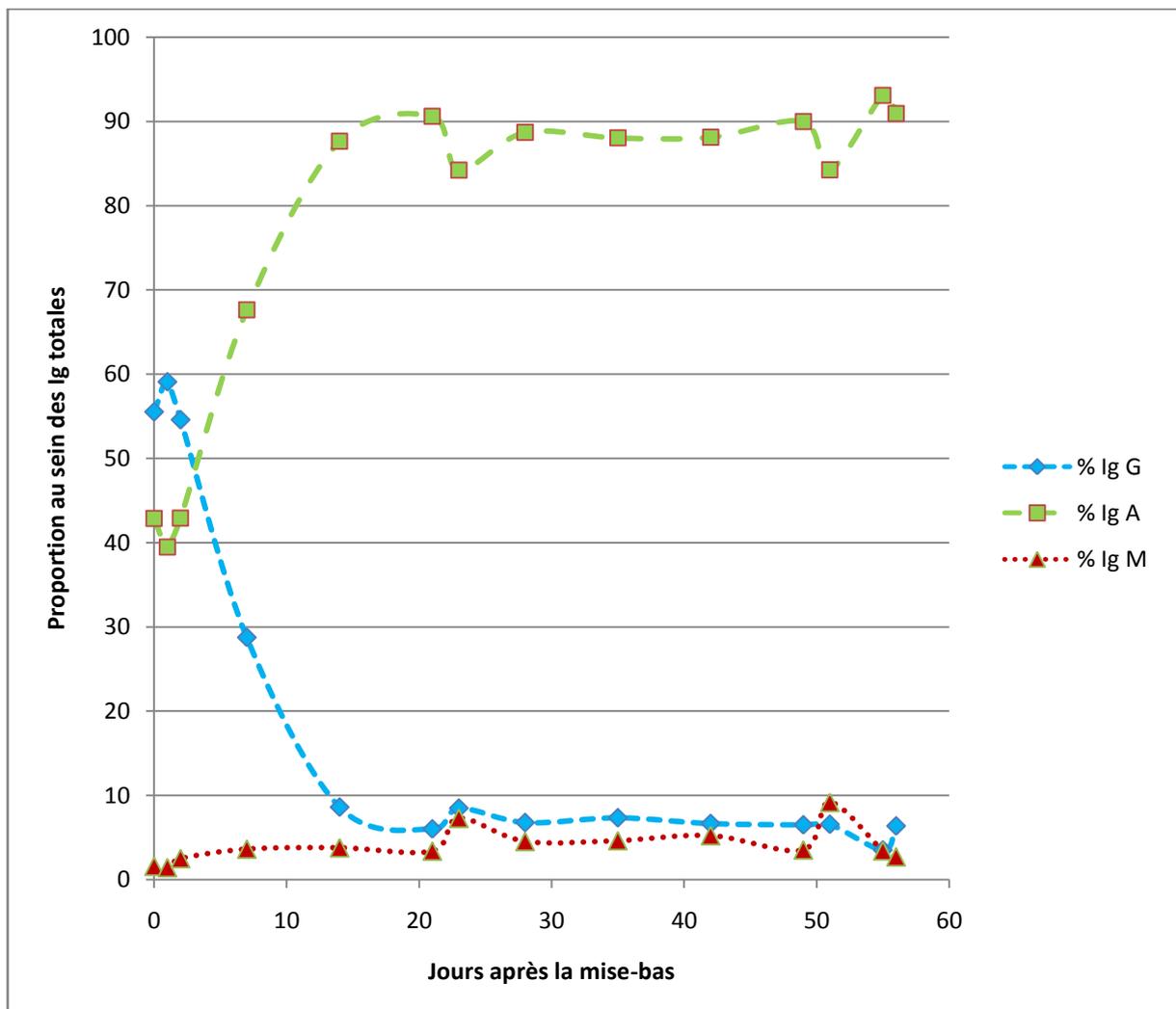


Figure 11 : Proportion des différents types d'immunoglobulines dans les sécrétions mammaires de chienne

d. Facteurs de variation de la qualité immunologique du colostrum

Nous rappelons que nous avons désigné par le terme « colostrum », les sécrétions mammaires collectées entre J0 et J2.

Nous définissons la qualité immunologique du colostrum par sa teneur en Ig totales. Nous considérons ainsi que plus la concentration en Ig totales est élevée, meilleure est la qualité du colostrum.

d1. Vaccination

La figure 12 représente l'influence du délai séparant le dernier rappel vaccinal et la mise-bas sur la concentration moyenne en immunoglobulines totales dans le colostrum, c'est-à-dire les sécrétions mammaires de J0 à J2 (inclus) post partum. Cette courbe (avec le coefficient de corrélation $r = -0,01$) nous montre qu'il est impossible d'établir une relation entre le délai écoulé depuis le dernier rappel vaccinal et la concentration en immunoglobulines dans le colostrum.

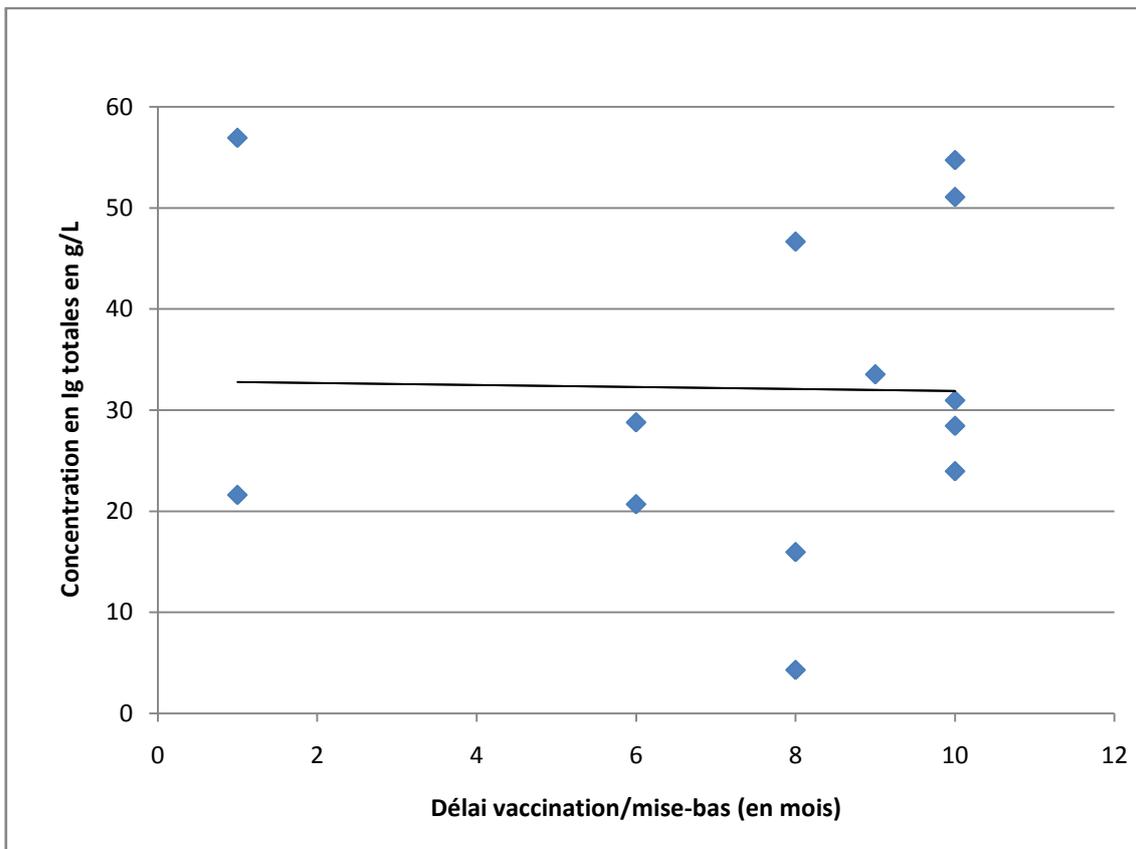


Figure 12 : Influence du délai entre la vaccination et la mise-bas sur la concentration en immunoglobulines totales du colostrum (n = 13)

d2. Taille et poids de la portée

L'importance de la portée peut se quantifier par le biais de plusieurs paramètres : le nombre de chiots, le poids total de la portée ou le poids moyen des chiots.

Aucun lien n'a pu être mis en évidence entre le nombre de chiots dans la portée et la concentration en Ig du colostrum (figure 13). Par exemple, $p= 0,86$ pour les Ig G et $p= 0,11$ pour les Ig A. Aucune influence du poids total de la portée (figure 14), ni du poids moyen des chiots au sein d'une portée (figure 15) n'a été non plus observé.

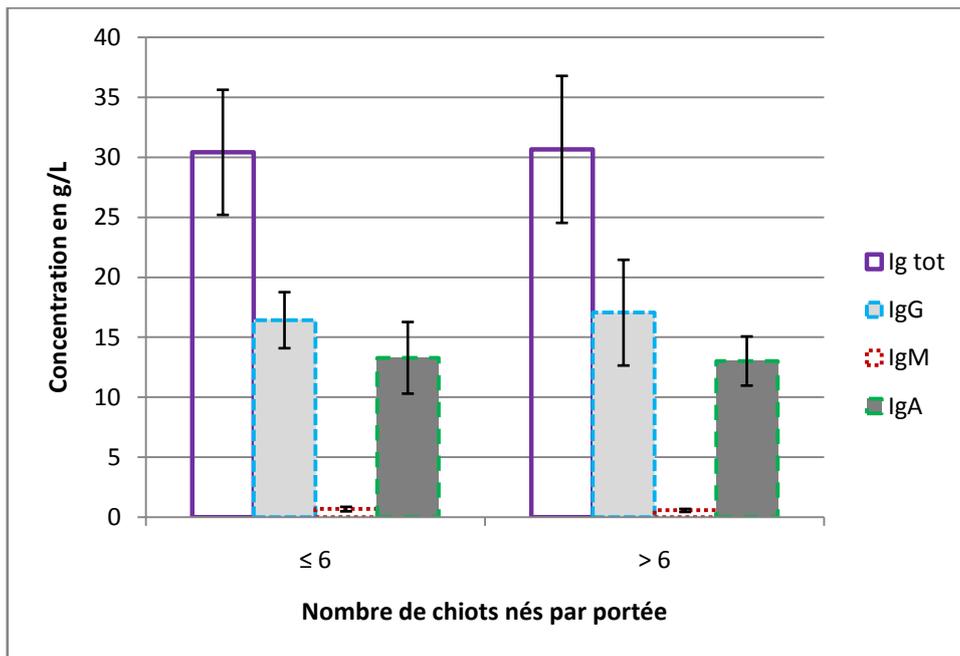


Figure 13 : Influence du nombre de chiots nés dans la portée sur la qualité du colostrum

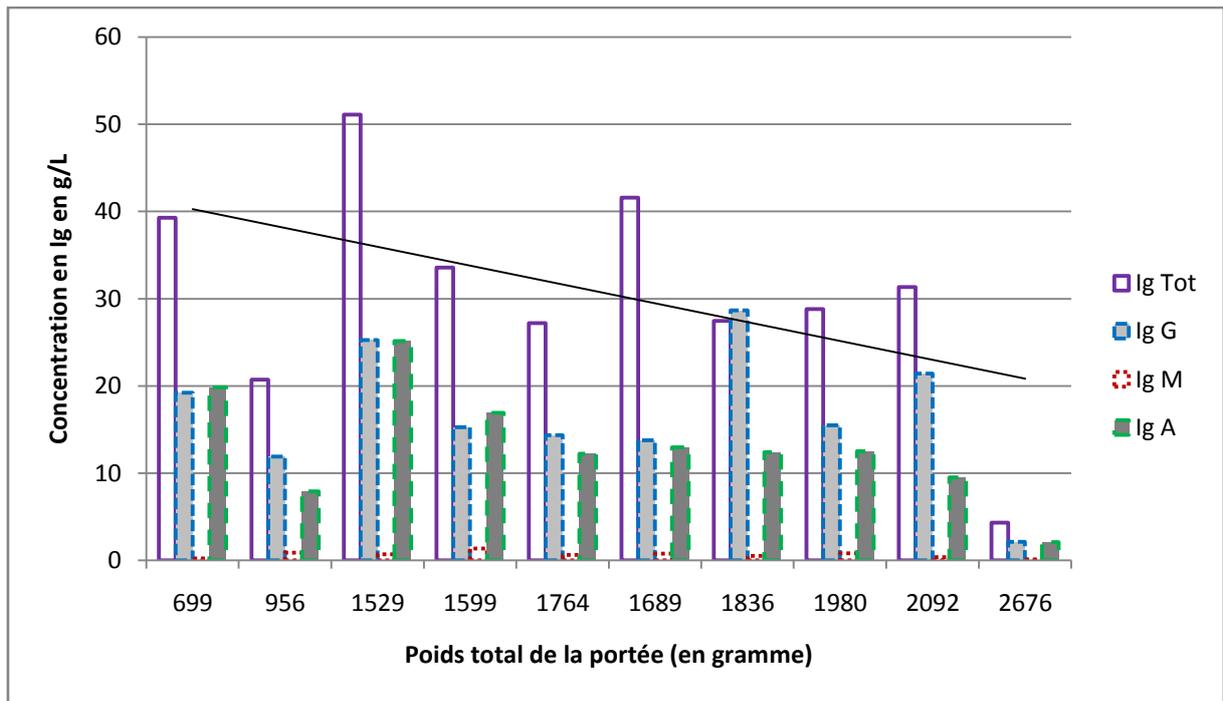


Figure 14 : Influence du poids total de la portée sur la qualité du colostrum

La droite de régression a été établie avec les concentrations en Ig totales.

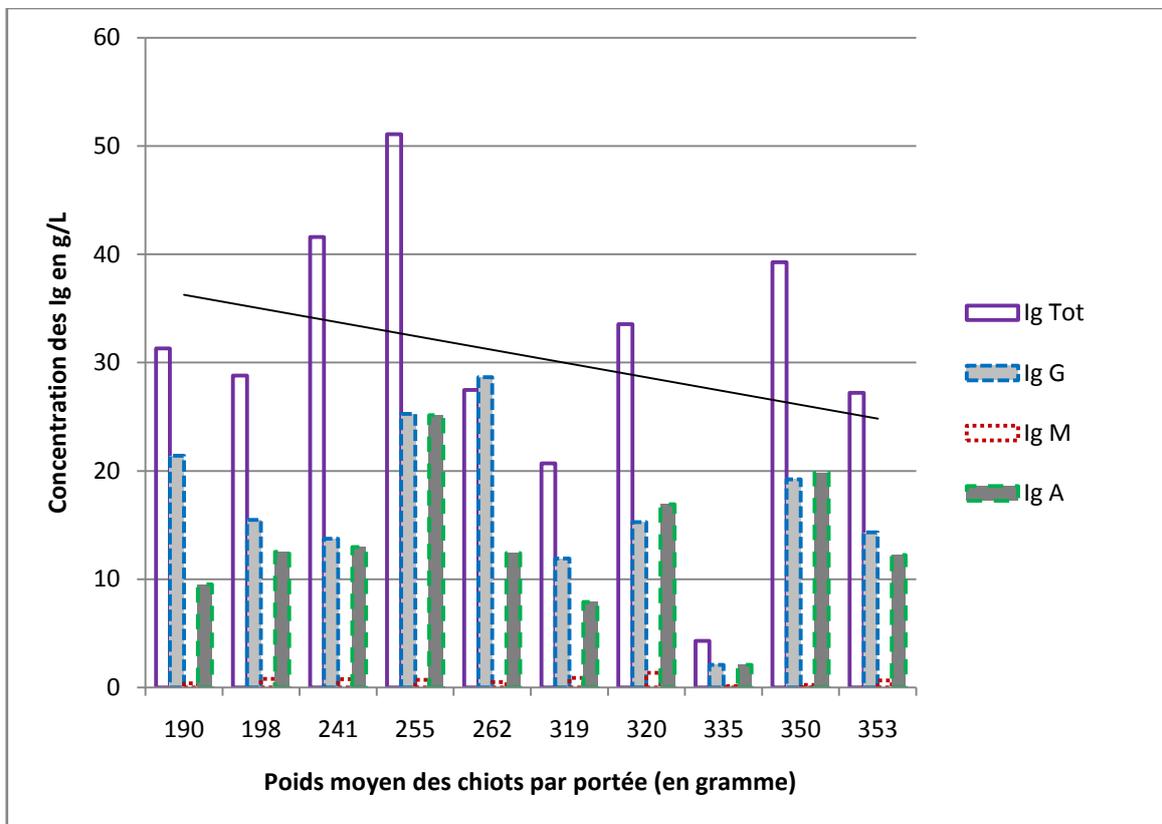


Figure 15 : Influence du poids moyen des chiots par portée sur la qualité du colostrum.

2. Sérum

a. Cinétique de la concentration en Ig G sériques au cours de la lactation

Les concentrations sériques en Ig G augmentent significativement de J0 à J2 ($p=0,003$) et de J2 à J7 ($p=0,014$). En effet, à J0, la concentration sérique moyenne en Ig G est de $8,0 \pm 0,6$ g/L ($n=9$), à J2 $11,2 \pm 0,7$ g/L ($n=9$) et $15,1 \pm 0,3$ g/L ($n=7$) à J7. A partir de J7 et jusqu'à la fin de la lactation, la variation des concentrations sériques en Ig G n'est pas significative, la concentration moyenne en Ig G est alors de $16,9 \pm 0,7$ g/L ($n=65$) (figure 16).

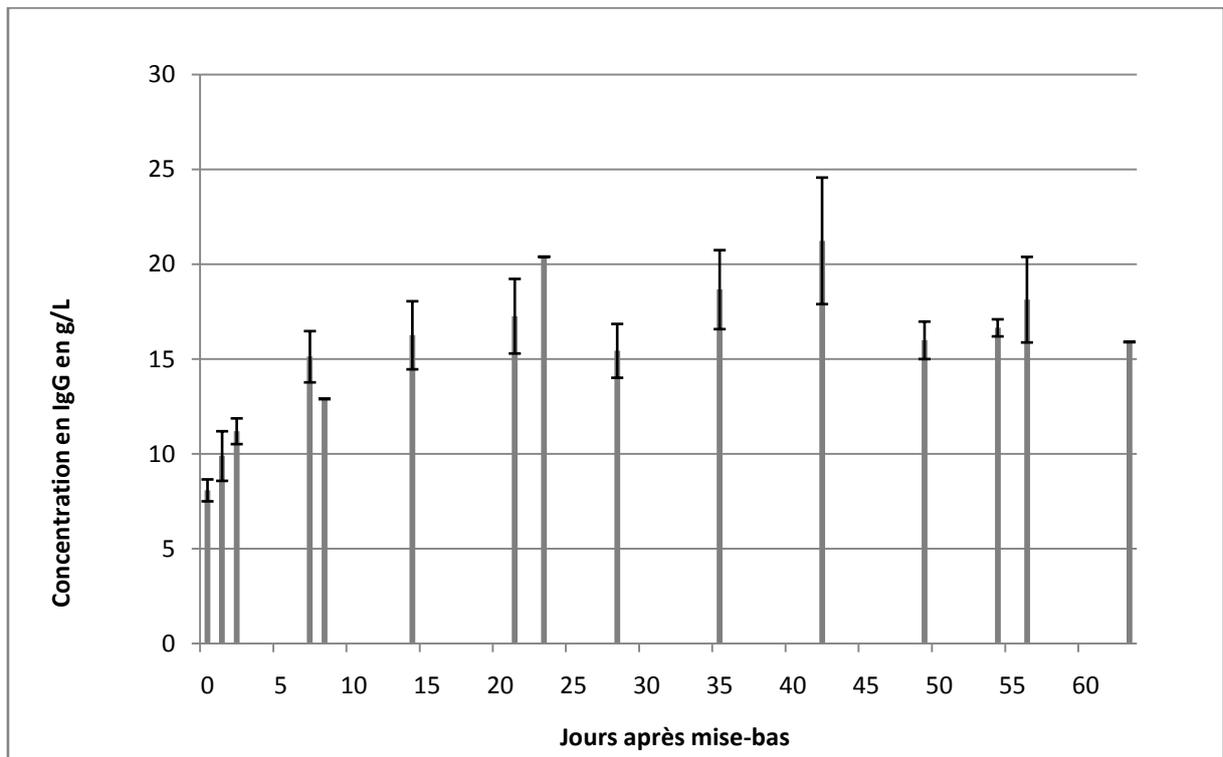


Figure 16 : Concentrations en immunoglobulines G dans le sérum des chiennes durant la lactation

b. Cinétique de la concentration en Ig M sériques au cours de la lactation

Les concentrations sériques en Ig M sont significativement différentes entre les deux premiers jours qui suivent la mise-bas, et le reste de la lactation ($p=0,007$). A partir de J2, les concentrations sériques en Ig M ne varient pas statistiquement (figure 17).

La concentration sérique moyenne en Ig M de J0 à J2 est de $2,34 \pm 0,1$ g/L ($n=20$), alors que pour le reste de la lactation, elle est de $2,96 \pm 0,1$ g/L ($n=57$). On remarque que ses concentrations sont beaucoup plus faibles que celles observées pour les Ig G, $16,9 \pm 0,7$ g/L en lactation contre $2,96 \pm 0,1$ g/L pour les Ig M.

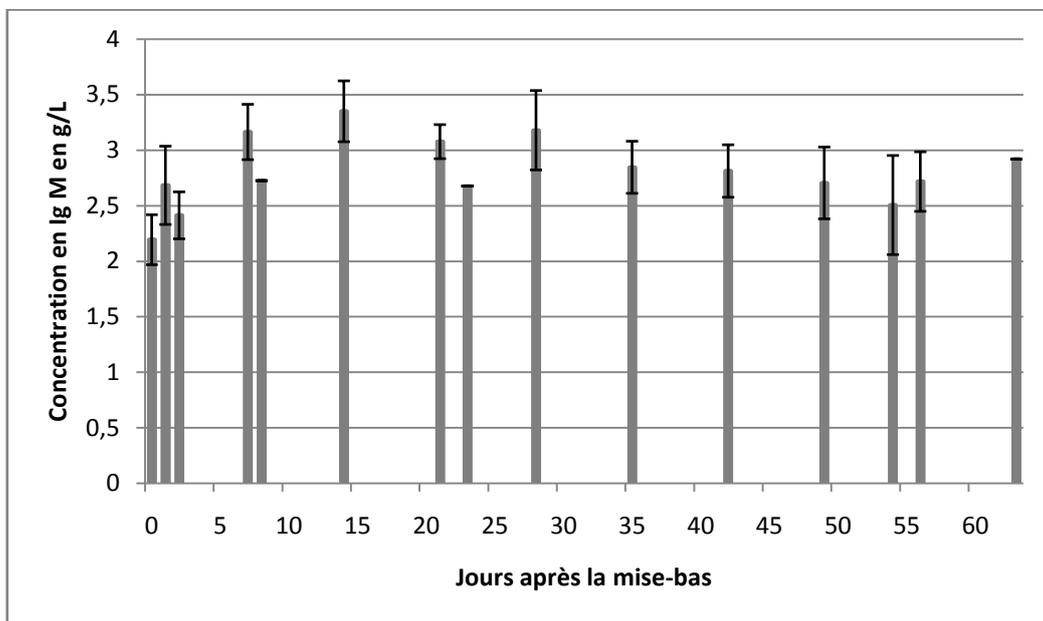


Figure 17 : Concentrations en immunoglobulines M dans le sérum des chiennes durant la lactation

c. Cinétique de la concentration en Ig A sérique au cours de la lactation

Durant les 10 premiers jours, les concentrations en IgA du sérum des chiennes sont statistiquement stables autour de $1,60 \pm 0,2$ g/L (n=27). Ensuite, cette concentration augmente et est significativement différente à J14 jusqu'à la fin de la lactation, avec une moyenne de $3,99 \pm 0,4$ g/L (n=50) (figure 18).

La variabilité inter individuelle est très importante au cours de la lactation. En effet, 28 jours post partum, le taux en Ig A sérique varie de 1,0 à 9,4 g/L et à 42 jours post partum, et de 0,4 à 2,0 g/L le jour de la mise-bas, soit une variation d'un facteur évoluant de 5 à 9.

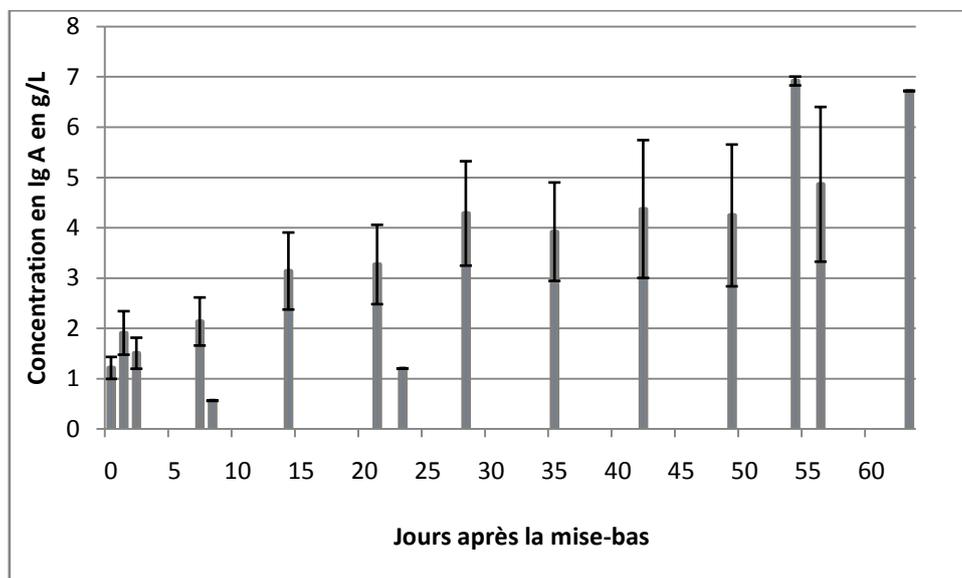


Figure 18 : Concentrations en immunoglobulines A dans le sérum des chiennes durant la lactation

3. Relation entre les concentrations sériques et colostrales en immunoglobulines

a. Ig G

La figure 19 représente la relation de la concentration sérique en Ig G et la concentration en Ig G colostrales. Cette courbe (avec $r = -0,12$) nous montre qu'il est impossible d'établir une corrélation entre ces deux concentrations.

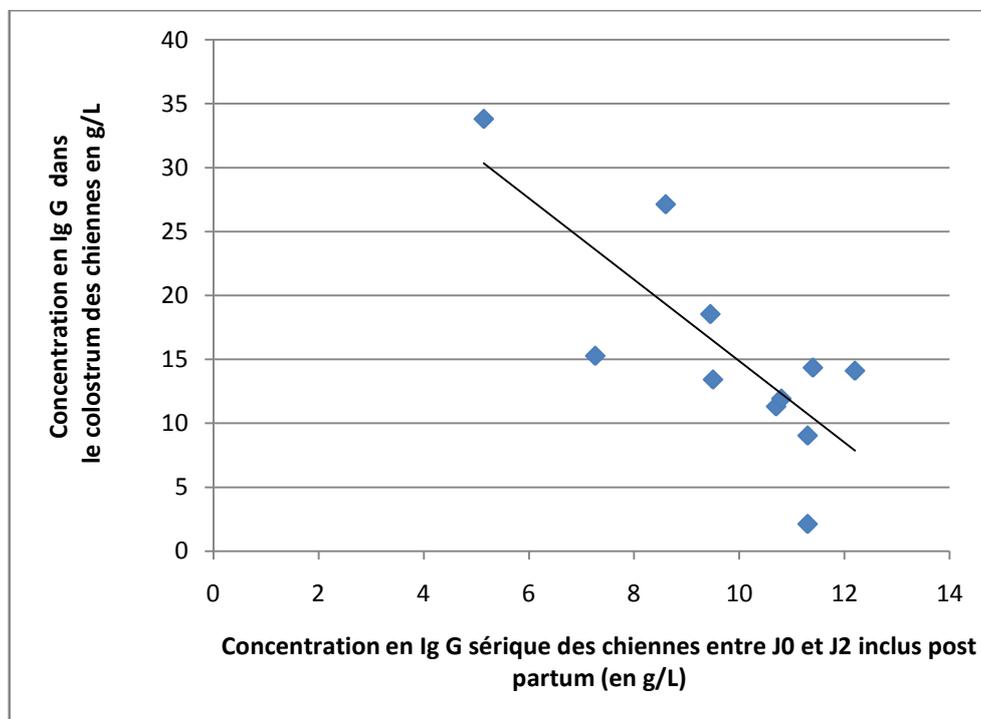


Figure 19 : Relation entre les concentrations sériques et colostrales en Ig G

On peut se demander si c'est le cas durant toute la lactation. La figure 20 présente donc la relation entre la concentration sérique en Ig G et celle des sécrétions mammaires à J28 post partum. Cette courbe (avec $r = -0,19$) nous montre qu'au milieu de la lactation, il est impossible d'établir un lien entre les concentrations sériques et lactées en Ig G.

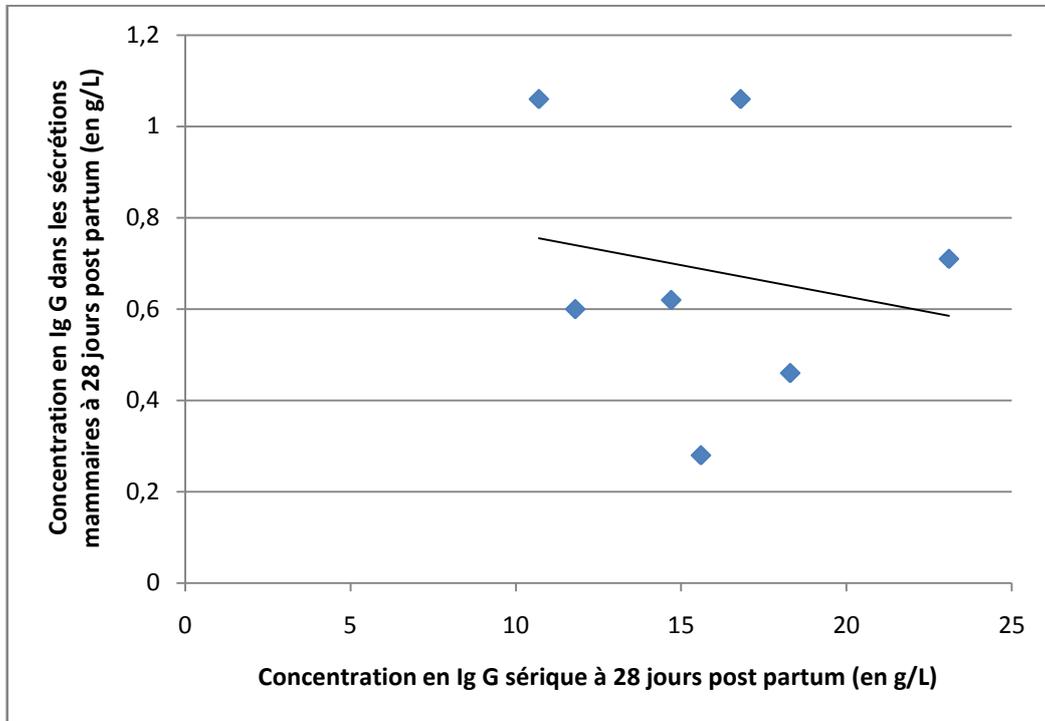


Figure 20 : Relation entre les concentrations en Ig G dans le sérum et dans les sécrétions mammaires à 28 jours après la mise-bas.

b. Ig M

Aucune corrélation entre taux sériques en Ig M et les taux colostraux n'est apparue ($r = -0,4$) (figure 21). Aucune relation n'a été non plus mise en évidence à J28 ($r = -0,4$) (figure 22).

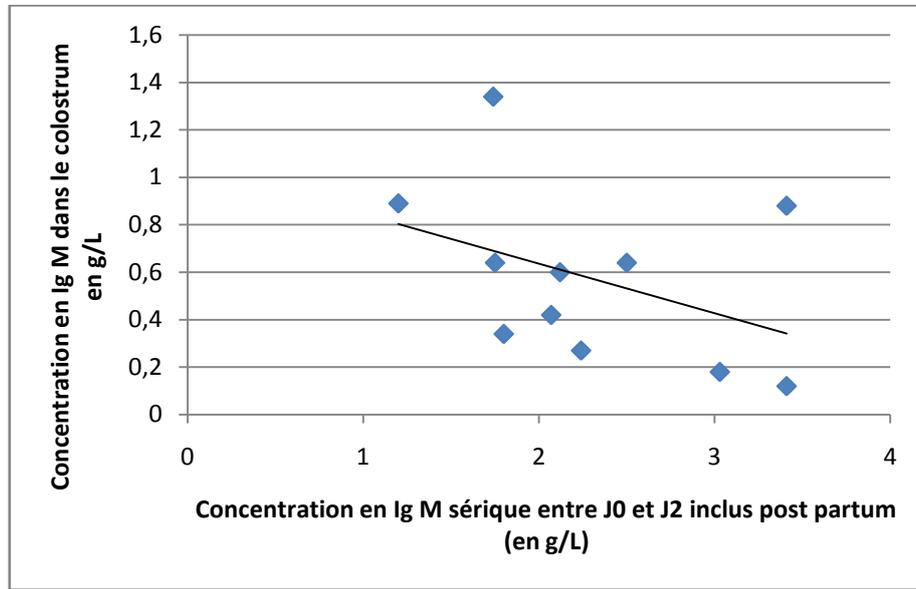


Figure 21 : Relation entre les concentrations sériques et colostrales en Ig M

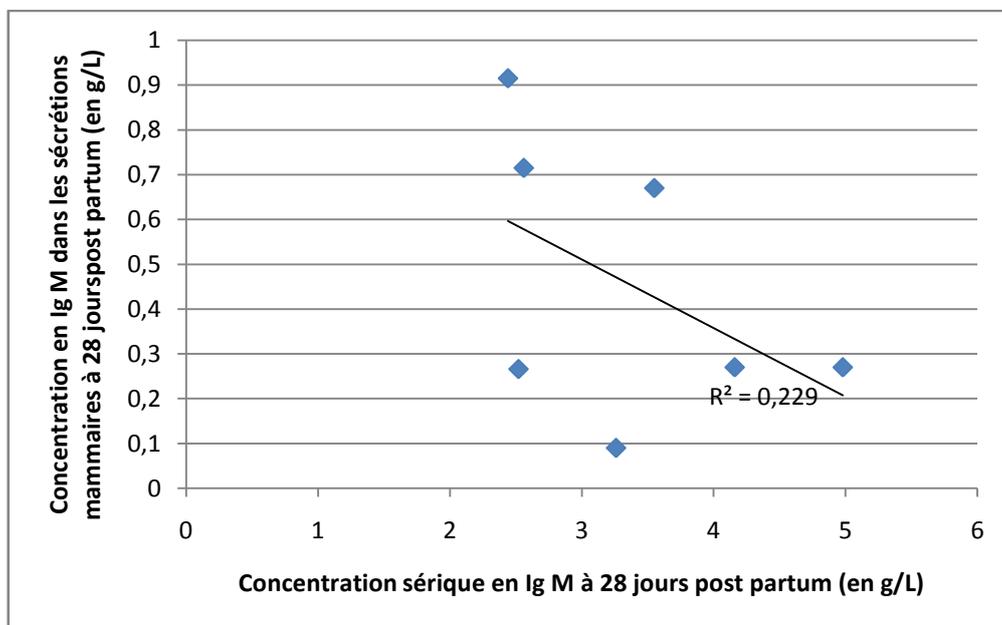


Figure 22 : Relation entre les concentrations en Ig M dans le sérum et dans les sécrétions mammaires à 28 jours après la mise-bas.

c. Ig A

La figure 23 ($r = 0,05$) ne fait pas apparaître de relation entre les concentrations sériques et colostrales en Ig A.

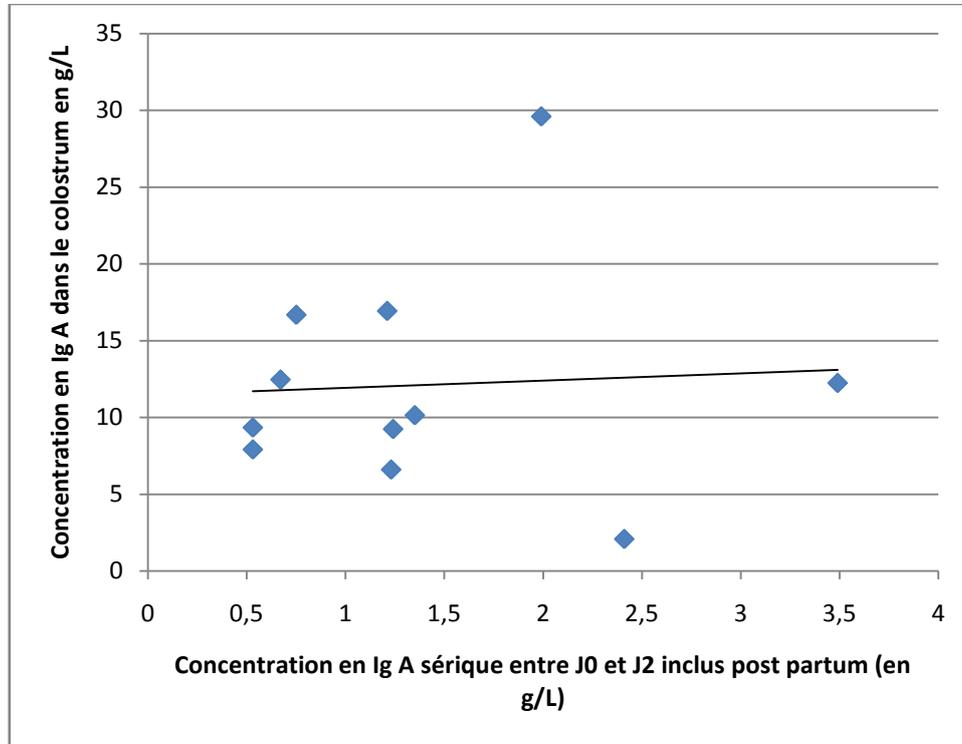


Figure 23 : Relation entre les concentrations sériques et colostrales en Ig A

De la même façon, aucune corrélation n'est apparue à J28 ($r = 0,3$) (figure 24).

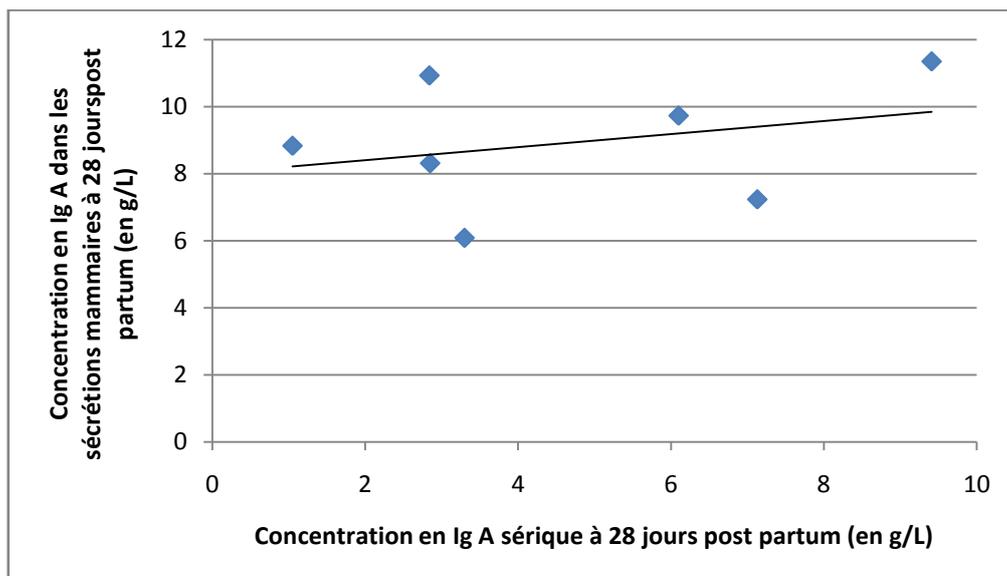


Figure 24 : Relation entre les concentrations en Ig A dans le sérum et dans les sécrétions mammaires à 28 jours après la mise-bas

d. Rapport entre les concentrations colostrales et sériques

Pour chaque animal, le rapport des concentrations en immunoglobulines colostrales (pour chaque classe) sur les concentrations en immunoglobulines sériques a été calculé. Les moyennes sont présentées dans le tableau 8.

Au total, il y a 2 fois plus d'immunoglobulines dans le colostrum que dans le sérum. Les Ig A sont en moyenne 13 fois plus concentrées dans le colostrum que dans le sérum (tableau 7) et 1,7 fois pour les Ig G. Les Ig M sont la seule classe d'Ig à être moins concentrées dans le colostrum que dans le sérum, il y en a 3 fois moins que dans le sang.

	Ig G	Ig M	Ig A	Ig tot
Moyenne du rapport Ig colostrales/Ig sériques (\pm SEM)	1,76 \pm 0,32	0,29 \pm 0,06	13,61 \pm 2,63	2,19 \pm 0,39

Tableau 7 : Moyenne du rapport Ig colostrale sur Ig sérique pour chaque classe d'Ig

III) Discussion

A. Limites de l'étude

1. Population étudiée

L'étude a eu lieu dans un lieu unique. Ceci supprime l'éventuelle variabilité de la pression microbienne et de l'immunité en fonction de l'élevage, de la localisation géographique, de la conduite d'élevage ainsi que de l'alimentation. Inversement, dans ce travail, les tétées n'étaient pas contrôlées pour refléter au maximum les conditions naturelles d'élevage.

Le choix d'une race unique (Beagle) a permis de s'affranchir des variations liées à la race. Il existe en effet une variation des proportions de lymphocytes sanguins circulants (entre les races canines) (Faldyna, et al, 2001) ainsi que des profils de réponses sérologiques induites par la vaccination (Kennedy et al, 2007). De plus, en ce qui concerne le colostrum, les concentrations en Ig γ subissent des variations inter-rationnelle, clairement démontrées dans l'espèce porcine : les truies Large-White et Landrace ont un colostrum plus riche en immunoglobulines G que celui des truies de race Piétrain (Voisin, 2005).

Il serait donc probablement intéressant de réaliser le même type d'étude que celle réalisée ici en race Beagle dans d'autres races, en particulier de comparer des races de petit et grand format. Il serait également intéressant d'étudier des colostrums issus de chiennes vivant dans différents élevages, afin en particulier de tenter de mettre en évidence des facteurs de la conduite d'élevage favorisant une meilleure qualité immunologique du colostrum.

2. Période de suivi

Aucun prélèvement n'a été effectué entre le deuxième et le septième jour après la mise-bas. Or, dans beaucoup d'espèces, c'est durant cet intervalle que le colostrum laisse place au lait (Klobasa et al., 1987 ; Weaver et al., 2000). Et nos résultats montrent que la composition en Ig des sécrétions mammaires varie de façon très importante entre J2 et J7 chez la chienne.

Pour décrire au mieux l'évolution des sécrétions mammaires, il faudrait donc avoir des prélèvements journaliers durant la première semaine après la mise-bas.

De plus, il aurait pu être intéressant de mesurer les taux sériques en Ig dès avant la mise-bas, pour voir s'il y avait une corrélation entre les taux sériques pendant la gestation et ceux du colostrum. Chez la truie, Voisin (2005) montre une homogénéité des concentrations sériques en Ig G 4 semaines avant la mise-bas, alors que l'immunité colostrale à la mise-bas était hétérogène. L'immunité 4 semaines avant mise-bas n'expliquait que 12% de l'immunité colostrale. Il pourrait être intéressant de faire de même dans l'espèce canine pour savoir si

les concentrations sériques en cours de gestation peuvent être un indice prédictif de la qualité du colostrum.

En outre, un suivi des taux sériques en Ig au cours de la lactation permettrait d'évaluer l'existence d'une immunosuppression physiologique en fin de gestation chez la chienne, contribuant par exemple à la réactivation de certains pathogènes néonataux comme l'herpes virus de type I.

3. Durée de gestation

Les mises-bas ont été réalisées par césarienne 61 jours post-ovulation. On peut s'interroger sur l'influence de cette gestion de la parturition sur la qualité colostrale.

En effet, l'étude de Beam et al. (2009) a montré que les veaux nés par césarienne ou les veaux nés grâce à l'intervention d'un vétérinaire (car mal positionné pour le vêlage) présentent un risque 2,6 fois plus élevé de déficit du transfert passif de l'immunité. Mais plus qu'une influence directe de la césarienne sur la qualité colostrale, le déficit pourrait s'expliquer par l'anoxie anténatale du veau.

4. Choix des classes d'Ig dosées

Les Ig E ont été dosées sur près de la moitié des échantillons. Les concentrations étant quasi nulles, les données ne sont pas présentées.

L'importance de cette classe d'immunoglobuline dans les sécrétions mammaires de la chienne n'a pas été étudiée. Il serait intéressant de doser les Ig E dans d'autres élevages (soumis à d'autres pathogènes) pour savoir si ces faibles taux sont retrouvés. Si c'est le cas, on pourrait se demander quel est le rôle et l'efficacité de cette classe d'Ig dans la prévention de la contamination du chiot.

Hine et al. (2010) rapporte une concentration en Ig E dans le colostrum ovin environ 4 fois supérieure aux concentrations en Ig E sériques (sérum prélevé 30 jours avant la mise-bas), contrairement aux concentrations en Ig E dans le lait qui ne représentent que 5% des IgE sériques (lait prélevé entre 6 et 8 semaines post agnelage). Les transports sélectifs des autres immunoglobulines (Ig G, M, et A) ont été bien étudiés (Watson, 1980), en revanche, l'existence d'un tel mécanisme n'a pas été démontré pour les Ig E. Pour Lascelles et al. (1981), les Ig E colostrales proviennent même entièrement du sang. Hine et al. (2010) s'interrogent sur l'existence d'un transport sélectif, le ratio Ig E colostrales/Ig E sériques étant de 4, ce qui est significativement inférieur à celui des Ig G1 et Ig A, proche de 8, mais supérieur à celui des Ig M proche de 2. Ainsi, un transport sélectif des Ig E pourrait être envisagé.

B. Composition en Ig des sécrétions mammaires de la chienne et facteurs d'influence

1. Composition en Ig des sécrétions mammaires de la chienne

Les concentrations en Ig G sont significativement plus élevées durant les 48 premières heures après la mise-bas qu'au cours de la lactation. Schafer et al. (2004) trouvent des résultats similaires (tableau 9), tant sur l'évolution au cours de la lactation que sur les concentrations mesurées.

Les concentrations en Ig M dans les sécrétions mammaires sont faibles durant toute la lactation ($0,6 \pm 0,09$ g/L) et aucune variation significative n'a été montrée au cours de la lactation. Ces concentrations sont équivalentes à celles trouvées par Schafer et al. (2004) mais inférieures à celles de Herbert et al. (1970), mais pour cette étude la variabilité n'est pas précisée (tableau 9).

Aucune différence significative dans les concentrations en Ig A n'a été démontrée au cours de la lactation. Cette stabilité des concentrations en Ig A au cours de la lactation est retrouvée dans l'étude de Schafer et al. (2004). En revanche, le tableau 8 montre que les concentrations en Ig A dans les sécrétions mammaires sont plus élevées dans notre étude que dans celle de Schafer et al. (2004) ou de Herbert et al. (1970). Par exemple, 24 heures après la mise-bas, la concentration en Ig A dans le colostrum est de $17,7 \pm 3,8$ g/L dans notre étude contre $9,9 \pm 4,3$ g/L dans celle de Schafer et al. (2004). De la même façon, la concentration moyenne en Ig A dans le colostrum est de $13,3 \pm 1,9$ g/L dans notre étude contre 3,13 g/L (écart-type non précisé) dans celle de Herbert et al. (1970).

Etudes	Herbert et al. (1970) *			Schafer et al. (2004) **			Notre étude ***		
Nombre de chiennes prélevées	4			6			10		
Race	American Foxhound			Rottweiler			Beagle		
Types d'Ig	G	M	A	G	M	A	G	M	A
Délai par rapport à la mise-bas (en jour) : 0							21,6±5,1	0,6±0,2	16,7±4,7
1				19,3±20,9	0,6±0,2	9,9±4,3	26,5±6,8	0,6±0,1	17,7±3,8
2				13,5±9,4	0,3±0,1	6,0±1,7	12,1±2,0	0,5±0,1	9,5 ±1,7
Colostrum	14,53	2,17 (0,7-3,7)	3,13 (1,7-5,2))				17,9±2,7	0,6±0,1	13,3±1,9
14				2,0±2,1	0,4±0,3	2,0±2,1	0,6±0,1	0,3±0,1	6,4±0,9
28				0,8±0,9	0,4±0,1	4,4±1,6	0,7±0,1	0,5±0,1	8,9±0,7

* Les données sont sous la forme, moyenne et écart-type.

** Les données sont sous la forme $X \pm SD$, SD représentant l'écart-type.

***Les données sont présentées sous la forme $X \pm SEM$.

Tableau 8 : Synthèse bibliographique. Concentrations des différentes classes d'Ig dans les sécrétions mammaires de chiennes (en g/L)

2. Proportion des Ig dans les sécrétions mammaires

Les résultats obtenus par Heddle et Rowley (1975) sur 4 chiennes croisées sont similaires aux nôtres (figures 11 et 25) : les Ig G sont majoritaires durant les premiers jours de lactation, puis diminuent très fortement en proportion jusqu'au 15^{ème} jour après la mise-bas. Dès le troisième jour, les Ig A constituent plus de 50% des Ig dans les sécrétions mammaires.

A partir de J15, environ 85% des Ig dans les sécrétions mammaires sont des Ig A, et une proportion équivalente d'Ig G et M est retrouvée, environ 7,5 %.

Cependant, la répartition 24 heures après la mise-bas selon Heddle et Rowley (1975) est de 80 % d'Ig G pour 18% d'Ig A, contre 59,1% et 39,5% dans notre étude (tableau 9). Cette différence n'est plus observée à 48 heures après la mise-bas.

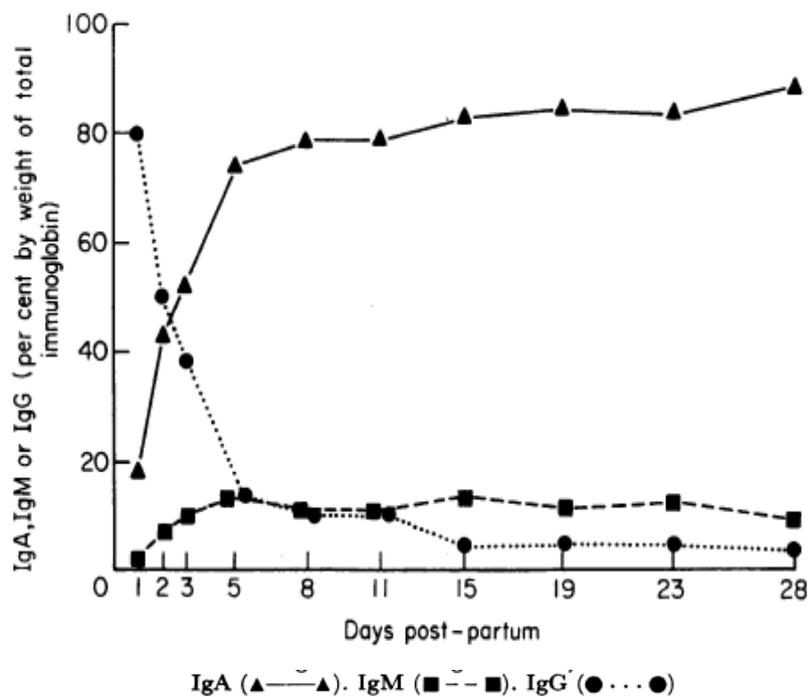


Figure 25 : Evolution de la proportion des différentes classes d'immunoglobulines dans les sécrétions mammaires de chienne au cours de la lactation, d'après Heddle et Rowley (1975).

Etudes	Heddle et Rowley (1975)				Notre étude			
Nombre de chiennes prélevées	4				10			
Race	Croisé				Beagle			
Types d'Ig	G	M	A	Tot en g/L (Moy) *	G	M	A	Tot en g/L (Moy ±SEM)
Proportion d'Ig le jour de la mise-bas	ND	ND	ND	15	55,5%	1,6%	42,9%	38,8 ± 8,1
Proportion d'Ig 24h après la mise-bas	80%	2%	18%	ND	59,1%	1,4%	39,5%	44,9± 8,1
Proportion d'Ig 48 h après la mise-bas	50%	8%	42%	2,5	54,5%	2,5%	43%	22,1 ± 3,6

* Les SEM ne sont pas précisés.

Tableau 9 : Synthèse bibliographique : proportion des différentes classes d'Ig dans le colostrum canin

On remarque que si nos études sont comparables pour les proportions des différentes classes d'Ig dans les sécrétions mammaires, les concentrations totales en Ig sont différentes. Le jour de la mise-bas, la concentration en Ig totale du colostrum dans notre étude est 2 fois plus élevée que dans l'étude de Heddle et Rowley (1975), et 7 fois plus élevée 48 heures après la mise-bas.

On peut se demander alors comment expliquer de telles différences.

Nous ne connaissons pas le statut vaccinal des chiennes utilisées dans l'étude de Heddle et Rowley (1975). De plus, Heddle et Rowley (1975) n'ont effectué aucune mesure du taux sérique en Ig, donc aucune comparaison (avec notre étude) ou corrélation (entre les taux sériques et colostraux) ne peut être **effectué**.

L'espèce porcine, comparable à l'espèce canine en termes d'anatomie mammaire (5 à 8 paires de mamelles) et de taille de portée, l'est également en ce qui concerne la composition en immunoglobulines des sécrétions mammaires. En effet, la forte concentration en Ig G du colostrum cède la place à une majorité d'Ig A durant la première semaine de lactation. Cependant, une différence notable est la placentation, épithéliochorial chez la truie (endothéliochorial chez les Carnivores domestiques). Cela signifie que 6 couches tissulaires séparent les endothéliums maternels et fœtaux, ce qui rend le passage transplacentaire des immunoglobulines impossible, et renforce la nécessité d'une prise immédiate à la naissance de colostrum par le porcelet.

Les similitudes entre ces deux espèces sont donc intéressantes et peuvent nous amener à surveiller de près les progrès dans la connaissance et les techniques de transmission de l'immunité de la truie aux porcelets, pour peut être pouvoir les appliquer dans l'espèce canine.

3. Facteurs de variation

La taille de la portée (nombre de chiots), le poids total de la portée ou le poids moyen du chiot n'intervient pas sur la qualité immunologique du colostrum.

En revanche, la taille de la portée influence la quantité de colostrum que chaque chiot va pouvoir ingérer. Or l'augmentation du nombre de chiots n'est pas associée à une augmentation de la concentration en immunoglobulines. Donc lors de portée nombreuse, pour que chaque chiot ait accès à la même quantité d'Ig, il faut que la quantité de colostrum produit augmente. Il serait donc intéressant d'étudier la quantité de sécrétions mammaires produites en fonction du nombre de chiots nés.

Récemment, l'influence des modifications endocriniennes en période peripartum a été étudiée. Une corrélation positive est observée entre les concentrations plasmatiques d'IGF-I et le volume et la teneur en IgG du colostrum. Des stratégies nutritionnelles sont donc recherchées afin de moduler les concentrations plasmatiques de prolactine et/ou de progestérone chez la truie en fin de gestation et d'en étudier les conséquences sur la production de colostrum (Foisnet, 2010). L'exploration de stratégies nutritionnelles pour améliorer tant la quantité que la qualité immunologique du colostrum serait intéressante chez la chienne.

4. Concentration sérique en Ig

Les concentrations sériques des trois classes d'Ig varient significativement au cours de la lactation. La concentration sérique en Ig G augmente de J0 à J2, puis de J2 à J7, pour se stabiliser le reste de la lactation (figure 16). La concentration sérique moyenne en Ig G calculée chez des chiens en l'absence de gestation varie de 9,2 g/L à 14,4 g/L (Herbert et al., 1970) (tableau 10). Or, la concentration moyenne en Ig G durant la lactation est de $16,9 \pm 0,7$ g/L, ce qui est supérieur aux concentrations sériques moyennes en Ig G hors gestation trouvées dans l'étude d'Herbert et al. (1970).

Les taux sériques en Ig M augmentent de façon significative le deuxième jour après la mise-bas pour rester ensuite stables tout au long de la lactation (figure 17), la concentration sérique moyenne en Ig M est alors de $2,9 \pm 0,09$ g/L. Heddle et Rowley (1975) présentent une concentration sérique moyenne en Ig M de 1,7 g/L, contre 1,45 g/L et 1,56 g/L dans l'étude de Herbert et al. (1970) selon la race (tableau 10). Dans notre étude, la concentration sérique en Ig M serait donc 2 fois supérieure à celle des deux autres études donnant des résultats hors gestation/lactation.

Les concentrations sériques en Ig A augmentent de façon significative 7 jours après la mise-bas, pour rester ensuite stables tout au long de la lactation (figure 18), la concentration sérique moyenne en Ig A est alors de $3,9 \pm 0,38$ g/L. Heddle et Rowley (1975) obtiennent une concentration sérique moyenne en Ig A de 0,5 g/L, contre 0,79 g/L et 0,83 g/L dans l'étude de Herbert et al. (1970) (tableau 10). Dans notre étude, la concentration sérique en Ig A serait donc 7 fois supérieure à celle des deux autres études.

Les concentrations sériques des 3 classes d'Ig sont augmentées durant la lactation par rapport aux concentrations sériques d'animaux ne présentant pas de gestation. Or pour savoir si cette augmentation est due à la lactation, il aurait fallu mesurer les taux sériques en Ig des chiennes avant, pendant, et après la gestation et idéalement sur des chiennes de la même colonie à la même période, au stade de dioestrus.

Etudes	Herbert et al. (1970)			Herbert et al. (1970)			Heddle et Rowley (1975)			Notre étude		
Nombre de chiennes prélevées	De 21 à 37			De 20 à 35			14			10		
Race	American Foxhound, English Foxhound et Colley			Croisé			Croisé			Beagle		
Types d'Ig	G	M	A	G	M	A	G	M	A	G	M	A
Absence de gestation	9,2	1,56 (0,7-3,0)	0,83 (0,4-2,4)	14,4	1,45 (0,8-2,1)	0,79 (0,3-2,4)	9,8	1,7 (0,7-2,7)	0,5 (0,2-1,2)			
Délai par rapport à la mise-bas (en jour) :										8,1±0,6	2,2±0,2	1,2±0,2
0												
2										11,2±0,7	2,4±0,2	1,5±0,3
28										15,4±1,4	3,2±0,4	4,3±1,0

Tableau 10 : Synthèse bibliographique. Comparaison des concentrations sériques des différentes classes d'Ig en présence ou en l'absence de lactation (en g/L).

5. Lien entre concentrations sérique et colostrale en Ig

a. Ig G

Nos résultats montrent des concentrations en Ig G sériques plus faibles durant les 2 premiers jours après la mise-bas qu'ensuite. Cela peut s'expliquer par le fait que les Ig G sont transférées du sérum pour la majeure partie alors que les Ig A, M et la partie restante d'Ig G sont produites localement. De plus, le ratio des concentrations en Ig G colostrale sur les concentrations en Ig G sérique étant de $1,76 \pm 0,3$ (tableau 8) il existe probablement un transport sélectif des Ig G, ou une synthèse locale, ou les deux.

Chez les bovins, les Ig colostrales dérivent en partie du sérum par filtration ainsi que l'ont révélé les études de transfert d'Ig radio-marquées de Newby et Bourne (1977). On a pu évaluer que 100% de leurs Ig G, 50 à 70% des Ig M, et 50% des Ig A proviennent de la filtration à partir du sérum et le reste (50% des Ig A, 30 à 50% des Ig M) est dû à la synthèse locale par les plasmocytes de la mamelle (Newby et Bourne, 1977).

La prééminence, chez les ruminants, des IgG1 sur les IgG2 dans les sécrétions mammaires s'explique par un passage transépithélial sélectif des IgG1, qui permet à ces Ig d'atteindre dans le colostrum des concentrations beaucoup plus élevées que dans le sérum dont elles sont issues. Ce transfert fait intervenir des récepteurs spécifiques des IgG1. Ce mécanisme, qui s'accélère dans les jours qui précèdent le vêlage, permet le transfert de quantités considérables d'IgG1 du sang vers la mamelle : en moyenne 1,5 kg chez la vache laitière dans les trois dernières semaines précédant le vêlage.

Une partie des IgG2, A et M est synthétisée localement par des plasmocytes du parenchyme mammaire des bovins. L'existence de cette synthèse locale d'Ig surajoutée à la transsudation est étayée par des méthodes de détection immunohistologique de plasmocytes à IgG1 et IgA (Sheldrake et al., 1984 ; Collins et al., 1986).

Notre étude n'a pas différencié les Ig G1 des Ig G2, il est impossible de savoir si le même phénomène est observé chez la chienne.

b. Ig M

Les Ig M sont beaucoup moins concentrées dans le colostrum que dans le sérum (tableau 8 : rapport des concentrations colostrales et sériques = $0,29 \pm 0,06$). Ainsi l'existence d'un transport sélectif des Ig M du sérum vers les sécrétions mammaires paraît peu probable. Dans les autres espèces, les Ig M proviennent à la fois d'un transfert du sérum et d'une synthèse locale (Bourne et Curtis, 1973).

c. Ig A

Les Ig A sont beaucoup plus concentrées dans le colostrum que dans le sérum (tableau 8 : rapport des concentrations colostrales et sériques = $13,61 \pm 2,63$). Cette très forte concentration colostrale peut avoir plusieurs origines : soit un transport sélectif des Ig A sériques vers les sécrétions mammaires, soit une production locale, soit les deux.

Des Ig A sécrétoires spécifiques de micro-organismes intestinaux ont été mis en évidence dans les sécrétions mammaires (Head et Beer, 1979). L'administration par voie orale de souche non pathogène d'*Escherichia coli* à des femmes a révélé la présence d'anticorps Ig A et de cellules formées à partir de ces Ig A dans les sécrétions mammaires, les anticorps Ig G et Ig M n'étant pas produits. L'hypothèse avancée est que les cellules sensibilisées par les antigènes ont migré du système gastro-intestinal aux glandes mammaires (Norcross, 1982).

Les immunoblastes seraient présentés à l'antigène au niveau des plaques de Peyer. Ils se différencieraient alors en blastocytes spécifiques de l'antigène, destinés à sécréter des Ig A. Ils migreraient via les nœuds lymphatiques mésentériques dans la circulation générale, et les glandes mammaires seraient une de leurs principales cibles. Ce lien immunologique intestinal-mammaire a été confirmé dans de nombreuses espèces (porc, bovin, rat) (Norcross, 1982).

Chez la truie, toutes les Ig G et une très grande partie des Ig M du colostrum proviennent du sérum. Cela contraste avec les Ig A dont seulement 40% proviendrait du sérum, ce pourcentage diminuant rapidement avec le début de la tétée. Par exemple, un prélèvement de colostrum collecté 6 heures après la parturition contiendrait seulement 11% d'Ig A sériques (Bourne et Curtis, 1973). Mais les Ig A ne représenteraient que 13 à 15% des Ig colostrales totales chez la truie (chez la chienne 18% pour Heddle et Rowley, 39,5% pour nous 24 heures après la mise-bas). L'Ig colostrale majeure chez la chienne reste l'Ig G, tout comme chez la vache et la brebis (Bourne et Curtis, 1973). Le colostrum apparaît dès lors d'un point de vue immunologique plus comme un transsudat qu'une réelle sécrétion.

En revanche, dans le lait, 90% des Ig A et M et 70% des Ig G seraient localement produits dans le tissu mammaire chez la truie. La transition entre le profil des Ig colostrales (majoritairement Ig G) au profil immunologique du lait (Ig A majoritaire) est totalement effectuée une semaine après la mise-bas chez la truie (Curtis et Bourne, 1971). Les Ig A étant donc majoritaires dans le lait, la production locale synthétise donc 90% des Ig du lait.

Cette situation du lait de truie contraste avec le lait de vache ou de brebis où les Ig G prédominent et les Ig A sont présents à de très faibles concentrations (Mach et Palud, 1971), mais le rapproche du lait de chienne.

C. Perspectives : alternatives au colostrum pour l'acquisition de l'immunité passive

1. Immunité homospécifique

L'échec du transfert passif de l'immunité (Failure of passive transfer of immunity, FPT en anglais, ETP en français) est une cause d'infection, de maladie et de mort très bien documentée chez les nouveau-nés des grands animaux (Weaver et al., 200).

Dans ces espèces, de nombreuses études ont montré que la concentration sérique en Ig G au cours des premiers jours de vie est le meilleur indice prédictif pour savoir si les nouveau-nés seront protégés contre les infections (Virtala et al., 1999).

Les veaux dont la concentration sérique en Ig G est inadéquate (c'est-à-dire inférieure à 8 g/L) ont un plus grand risque de mortalité avant le sevrage (ratio = 5,4), de morbidité néonatale (ratio = 6,4) et de morbidité avant sevrage (ratio = 3,2) (Wittum et Perino, 1995).

Aucun seuil de ce type n'a été mis en évidence chez le chien. Même si les infections sont des causes communes de mortalité chez les chiots et chatons (Favier 2001), aucune étude n'a recherché la corrélation entre concentration sérique en Ig G et risque d'infection, ou entre échec de transfert passif de l'immunité et risque d'infection dans l'espèce canine. Plusieurs explications sont envisageables : la difficulté de réaliser des prises de sang chez le chiot nouveau-né, filière peu structurée...

Les chiots susceptibles de présenter un FPT sont ceux qui n'ont pas de contact avec leur mère le premier jour de la naissance (orphelins ou rejetés par la mère avant les premiers soins) ceux issus d'une très grande portée, les chiots petits et faibles ou encore ceux dont la mère n'a pas de lait le premier jour de la naissance. On peut également faire l'hypothèse que certaines chiennes produisent un colostrum à trop faible concentration d'Ig (l'absence d'étude de la qualité colostrale à grande échelle dans cette espèce rend cette donnée non disponible).

L'impact économique du FPT chez les espèces de rente a conduit au développement de nombreux suppléments en immunoglobulines pour prévenir et traiter cet échec de transfert passif de l'immunité. Contrairement à ces espèces, très peu d'études ont été menées sur l'administration d'immunoglobulines chez les nouveau-nés des animaux de compagnie. Evidemment, l'administration de colostrum provenant d'une autre chienne de l'élevage paraît être la meilleure solution. Cette solution a bien des avantages, notamment que la chienne prélevée et les nouveau-nés vivant dans les mêmes conditions, ils ont soumis au même microbisme d'élevage. Dès lors, la protection fournie par la mère de substitution est complètement adaptée aux conditions de vie des chiots.

Mais cela n'est pas toujours possible : les élevages canins ayant des effectifs en général restreints, et n'ayant ni de période de mise-bas ni conduite en bande, la probabilité d'avoir deux chiennes mettant bas à quelques jours d'intervalle est moindre. D'autres stratégies ont donc été explorées, les immunoglobulines données aux chiots pouvant être sériques ou colostrales, canines ou hétérosécifiques.

a. Sérum autologue

En cas d'absence de colostrum, Bouchard et al. (1992) proposent l'administration de 8mL (voire 16mL avec de meilleurs résultats) de sérum, à la naissance et 12h après, par voie orale ou sous-cutanée. Le sérum est prélevé des chiens adultes, en bonne santé et récemment vaccinés. Les deux voies d'administration permettent d'atteindre les mêmes concentrations sériques.

Le groupe ayant reçu 16mL par voie sous-cutanée présentent les taux d'Ig les plus proches du groupe de chiots ayant reçu du colostrum par leur mère. Le sérum semble donc être une alternative satisfaisante au colostrum, la douleur liée à l'injection pouvant être minime si celle-ci est réalisée doucement.

Levy et al. (2001) confirment chez des chats l'intérêt de l'utilisation du sérum d'adulte comme source d'immunoglobulines pour les nouveau-nés qui en sont privés. Cependant, cette étude va même plus loin puisque l'administration parentérale de sérum de chat adulte à la dose de 150 mL/kg (soit environ 15mL pour un chaton à la naissance) aboutirait à une concentration sérique en Ig G normale chez les chatons, et donc une diminution du risque de FPT chez ces patients.

Inversement, Poffenbarger et al (1991) n'ont pas réussi à démontrer l'utilité de l'utilisation du sérum chez les chiots privés de colostrum (aucune augmentation des taux sériques en Ig chez ces chiots) mais les quantités administrées était beaucoup plus faibles que dans les deux études citées précédemment (22mL/kg, soit 2,2 mL pour 100g, soit presque 7 fois moins que pour Levy et al. 2001).

Le problème reste la constitution du sérum à administrer. Il doit provenir d'animaux dont on connaît le statut sanitaire, et qui possèdent un taux suffisant d'anticorps des pathogènes spécifiques de l'espèce grâce à la vaccination ou à l'exposition naturelle. Idéalement et en particulier chez le chat, le sérum des donneurs doit aussi être typé pour éviter les risques d'érythrolyse néonatale.

b. Colostrum congelé

On peut penser que comme chez les grands animaux et notamment pour les veaux, pour palier le manque éventuel de colostrum, une solution peut être la congélation du colostrum. Aucune étude n'a été menée chez le chien mais chez la vache, on sait que cette congélation ne modifie pas les concentrations en Ig du colostrum, et qu'il peut ainsi être conservé 6 mois (jusqu'à un an pour certains) à -20°C (Foley et Otterby, 1978). Il peut aussi être gardé réfrigéré à 1-2°C pendant une semaine maximum.

La décongélation doit se faire au bain-marie, dans de l'eau à 50°C. Il ne faut surtout pas le décongeler à la température de la pièce, puisque le nombre de bactéries double toutes les vingt à trente minutes à température ambiante (Foley et Otterby, 1978). Une étude récente menée à l'Université du Minnesota a permis de constater que le colostrum pouvait être chauffé à 60°C sans que les anticorps ne soient endommagés. Cependant, lorsque le colostrum est chauffé à 63°C, le nombre d'anticorps diminue de 34% (Johnson et al., 2007).

Pour réduire le taux d'organismes pathogènes, la pasteurisation du colostrum à la ferme peut être envisagée. Les nouveaux appareils de pasteurisation sont faciles à utiliser. La pasteurisation permet d'améliorer la salubrité du colostrum. En effet, d'après Johnson et al (2007), une différence significative quant à la charge bactérienne est observée entre le colostrum brut (sans traitement) et celui ayant été chauffé (60 min à 60 °C en utilisant un système de pasteurisation classique), le comptage total en coliformes étant respectivement de 3,62 et de 1,18 log CFU/mL.

De plus, la pasteurisation n'a pas d'effet significatif sur la concentration en Ig G du colostrum (Johnson et al. 2007).

c. Colostrum d'une chienne gravide

A titre indicatif, des sécrétions mammaires ont été prélevées chez une chienne une semaine avant la mise-bas tous les jours : les concentrations des différentes classes en Ig sont stables durant la semaine précédant la mise-bas (figure 26). De plus, elles sont équivalentes à celles que l'on retrouvera en moyenne le jour de la mise-bas.

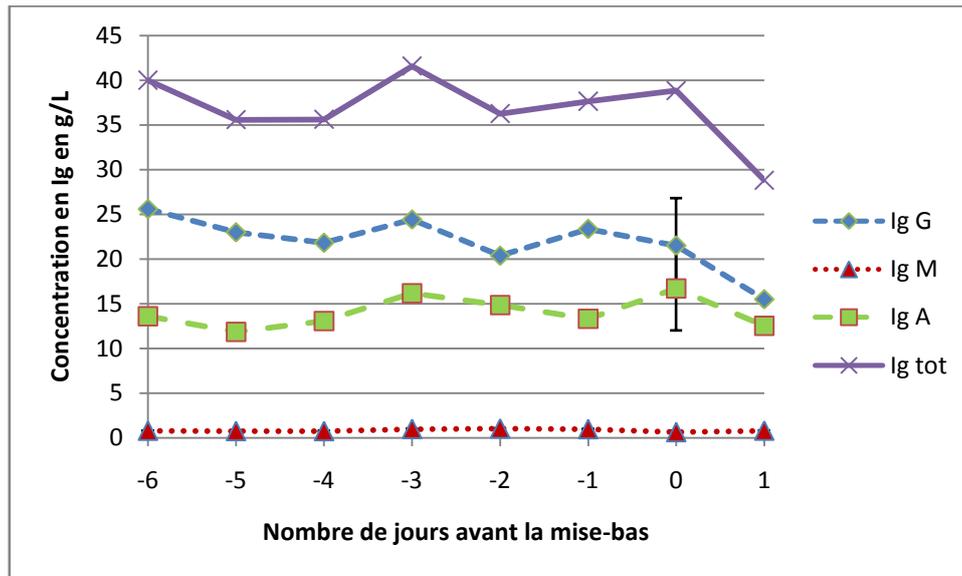


Figure 26 : Evolution des différentes classes d'Ig dans les sécrétions mammaires d'une chienne durant la semaine précédant la mise-bas

On pourrait donc envisager de traire une chienne avant la mise-bas pour nourrir, et faire le transfert de l'immunité des chiots sans mère.

Si un colostrum de haute qualité n'est pas disponible en quantité suffisante, le recours à des suppléments de colostrum commerciaux peut être un moyen valable d'augmenter l'immunité des nouveau-nés.

2. Immunité hétérospécifique

Les germes les plus souvent responsables d'infection bactérienne sont *E coli*, *Staphylococcus*, et *Streptococcus* bêta-hémolytiques (Lussier, 2002). Ces bactéries à l'origine de septicémie néonatale ne sont pas spécifiques d'espèce. Les anticorps provenant d'une espèce pourrait donc protéger d'autres espèces des infections. Les résultats de nombreuses études (Pierce et Smith, 1967 ; Holmes et Lunn, 1991) ont prouvé que les nouveau-nés pouvaient être protégés de nombreux pathogènes grâce à l'administration d'Ig G étrangères.

Une étude menée sur les chats (Crawford et al., 2003) montre que la supplémentation en IgG félines aux chatons augmente in vitro la phagocytose de *S. aureus* par les neutrophiles félines, au contraire des IgG équines (même si elles contiennent des anticorps spécifiques contre *S. aureus*). Ce résultat suggérerait que les Ig G équines pourraient opsoniser les bactéries, mais que les immuns complexes ne pourraient pas se lier au récepteur Fc γ des neutrophiles félines. Or, cette reconnaissance est essentielle dans le déclenchement de la cascade de phagocytose. Bien qu'il ait été mis en évidence une conservation de la structure et de la fonction des récepteurs Fc γ entre certaines espèces (Lilliehook et al., 1998), ni les récepteurs Fc γ des neutrophiles félines ni leur affinité pour des Ig d'autres espèces n'ont été étudiés.

De plus, bien que dans cette étude les concentrations en Ig G considérées comme protectrices ont été atteintes chez les chatons, l'échec in vitro des Ig G équines à promouvoir la phagocytose bactérienne suggère que ces anticorps n'atteindraient pas leur but thérapeutique de prévention des infections.

En outre, en comparant les temps de demi-vie des Ig G spécifiques d'espèce, l'administration d'Ig G provenant d'une autre espèce à des poulains (Holmes et Lunn, 1991) et à des porcelets (Curtis et Bourne, 1973) a montré des temps de demi-vie plus courts.

De la même façon, dans l'étude de Crawford et al. (2003), les temps de demi-vie des Ig G provenant des chevaux étaient significativement plus courts que ceux des Ig G de chat, les deux étant administrés par voie sous cutanée à des chatons. Une hypothèse explicative avancée serait la non ou la mauvaise protection de ces Ig contre les enzymes protéolytiques dans le tractus intestinal qui les rendrait plus vulnérable au catabolisme.

Dans l'espèce canine, l'utilisation d'immunoglobulines provenant d'autres espèces peut être envisagée dans la protection de certaines bactéries non spécifiques, on peut penser entre autres à *E. coli*. D'ailleurs, des concentrés d'Ig bovins sont déjà commercialisés. Par exemple le Locatim[®] (Merail, Lyon, France) est un lactosérum bovin concentré contenant des immunoglobulines G spécifiques dirigées contre *E. coli* facteur d'adhésion F5 (K99) $\geq 2,8^*$ log₁₀/ml. On peut donc penser que celui-ci pourrait être utilisé dans l'espèce canine.

Cependant, à la lumière de cette expérience, il faudrait donc s'attacher à ce qu'il y ait une reconnaissance entre ces Ig et le récepteur Fc γ des neutrophiles canins. L'idéal serait de développer des concentrés d'immunoglobulines canines, mais cela paraît difficile vu l'impact économique de la filière de l'élevage canin.

3. Voie d'administration

Si l'on s'inspire des études menées sur les grands animaux, la voie d'administration des suppléments en Ig dépend du temps écoulé entre cette administration et la mise-bas. En effet, avant la fermeture de la barrière intestinale (soit 15 ou 14h post mise-bas dépendant des études), la voie orale permet d'atteindre des concentrations en Ig G sériques chez les nouveau-nés considérées comme adéquates. Après la fermeture de la barrière intestinale, l'administration par voie parentérale permet aussi d'atteindre ces concentrations dites « seuils » (Rumbaugh, 1979).

Les études de Bouchard et al. (1992) et Levy et al. (2001) chez le chiot et le chaton respectivement montrent pas de différence selon la voie d'administration, lorsque celle-ci est effectuée directement à la naissance. Par contre, selon Crawford et al. (2003) la voie sous-cutanée paraît permettre une meilleure absorption, avec des niveaux sériques plus élevés pendant une plus longue période.

Des explications sont apportées sans que rien ne soit prouvé. L'administration par voie orale conduirait à une saturation des mécanismes de transport des macromolécules par les protéines non-immunoglobulines contenues dans ces suppléments (Besser et Osborn, 1993). Mais dans ce cas, cela n'expliquerait pas les taux d'Ig G plus faibles chez les chatons ayant reçu leur supplément par voie orale puisque les Ig G équine ont été purifiées des autres protéines (contrairement aux Ig G félines), sans pourtant de différence dans l'absorption. Une autre explication est que par voie orale, l'absorption doit survenir avant la fermeture de la barrière intestinale.

De plus, les préparations en Ig ne contiennent pas d'inhibiteurs de trypsine naturellement présents dans le colostrum. Or ces molécules protègent les Ig du colostrum des dégradations protéolytiques, les Ig sont donc plus nombreuses à pouvoir passer la barrière intestinale, et donc plus nombreuses à se retrouver dans le sérum (Quigley et al., 1995).

De plus, il a été montré chez les veaux que l'efficacité de l'absorption des Ig G était variable selon le type de processus utilisé pour la préparation de chaque supplément (Quigley et al., 2001).

A l'heure actuelle, on voit que plusieurs solutions de remplacement au colostrum maternel ont été envisagées, mais on ne dispose pas de substituts de colostrum efficaces chez le chiot.

CONCLUSION

Les sécrétions mammaires de la chienne sont finalement assez peu connues. Les essais rapportés dans la littérature ont été effectués sur un faible nombre d'animaux, ce qui explique la grande variabilité. Cette variabilité a déjà été mise en évidence dans d'autres espèces (porcine par exemple, Voisin, 2005) sans que des facteurs puissent être identifiés. Cependant, cela nous montre la nécessité d'avoir des études plus larges pour tenter d'identifier les facteurs de variation de la qualité du colostrum.

Notre étude n'a porté que sur les sécrétions mammaires. Il serait nécessaire de comparer la concentration en Ig dans le colostrum et la concentration sérique en Ig des chiots, pour déterminer le délai d'ouverture de la barrière intestinale après la naissance.

Il serait important de savoir à quel moment la barrière digestive des chiots nouveau-nés se referme.

Chez la vache, on estime la qualité du colostrum grâce à la mesure de son taux en immunoglobuline grâce au pèse-colostrum. On sait que pour être efficace, celui doit contenir au moins 50g/L d'immunoglobuline, sinon le veau est « à risque » et des mesures doivent être entreprises.

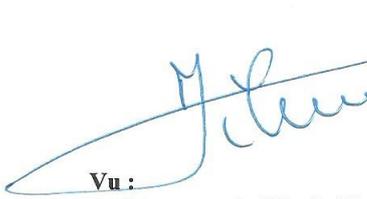
La recherche des valeurs « seuils » des concentrations sériques en Ig à atteindre chez le chiot nous permettraient aussi dans l'espèce canine d'évaluer la qualité du colostrum « au chevet » de la chienne afin de prévenir les échecs de transfert passif de l'immunité en complétant les chiots.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussignée, **CHASTANT Sylvie**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **Marie-Blanche BERTIERI** intitulée « *Etude de la concentration en immunoglobulines des sécrétions mammaires de la chienne* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.


Fait à Toulouse, le 25 mai 2012
Docteur Sylvie CHASTANT
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse


Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON




Vu :
Le Président du jury :
Professeur Antoine BLANCHER


Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT

Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

Bibliographie

Adkins Y, Lepine AJ, Lonnerdal B. Changes in protein and nutrient composition of milk throughout lactation in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 2001, 62, 1266-1272.

Appel, M. and Gillespie, J. H. Canine distemper virus. In: *Virology Monographs*. II, Gard, S., Hallauer, C. and Mayer, K. F. (Ed.) Springer-Verlag, New York, 1972, 1 - 96.

Arnaud S. Allaitement artificiel du chiot orphelin et troubles du comportement. Thèse en médecine vétérinaire de Nantes, 2004, n°31, 112.

Banks KL, Macguire TC. Neonatal immunology. Halliwell REW, Gorman NT, eds. *Veterinary clinical immunology*. Philadelphia: WB Saunders Co, 1989.

Barber JS, Trees AJ. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *International Journal for Parasitology*, 1998, 28, 57-64.

Beam A.L, Lombard J.E, Koprak C.A, Garber L.P, Winter A.L, Hicks J.A, Schlater J.L. Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92, 8, 3973-3980.

Bebiak DM, Lawler DF, Reutzel LF. Nutrition and management of the dog. *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*, 1987, 17, 531-533.

Besser TE, Osborn D. Effect of bovine serum albumin on passive transfer of immunoglobulin G1 to newborn calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1993 ; 37 : 321-327.

Blanchard G, Paragon BM. L'alimentation des chiens, éditions France Agricole, 2008, 38-39.

Bouchard G, Plata Madrid H, Youngquist RS, Buening GM, Ganjam VK. Absorption of an alternate source of immunoglobulin in pups. *American Journal of Veterinary Research*, 2002, 53, 230-233.

Bourne FJ, Curtis J. Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum, and milk and the serum of young pigs. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1971, 236, 319-332.

Bourne FJ, Curtis J. Half lives of immunoglobulins Ig G, Ig A and Ig M in the serum of newborn pigs. *Immunology*, 1973, 24, 147-155.

Bourne FJ, Curtis J. The transfer of immunoglobulins Ig G, Ig A and Ig M from serum to colostrum and milk in the sow. *Immunology*, 1973, 24, 157.

Carpenter G. Epithelial growth factor is a major promoting agent in human milk. *Science*, 1980, 210 : 198.

Casal ML, Jezyk, PF and Giger U. Transfer and colostrum antibodies from queens to their kittens. *American Journal of Veterinary research*, 1996, 57, 1653-1658.

Case L.P, Carey D.P., Hirakawa D.A, Daristotle L. Nutritional care of neonatal puppies and kittens. *Canine and Feline Nutrition. A resource for Companion, Animal Profession*. Second edition, Mosby, Saint Louis, 2000, 233-243.

Center SA, Randolph JF, Manwarren T, Slater M. Effect of colostrums ingestion on gamma-glutamyltransferase and alkaline phosphatase activities in neonatal pups. *American Journal of Veterinary research*, 1991, 52, 499-503.

Chappuis, G. Neonatal immunity and immunization in early age: lessons from veterinary medicine. *Vaccine*, 1998, 16, 1468-1472.

Collins RA, Parsons KR, Bland AP. Antibody containing cells and specialized epithelial cells in the bovine teat. *Research in Veterinary Science*, 1986, 41, 50-55.

Concannon PW. Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reproduction in Domestic Animals*, 2009, 44(suppl. 2), 3-15.

Concannon P, Tsutsui T, Shille V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility*, 2001, 57, 159-169.

Crawford C, Hanel RM, Levy JK. Evaluation of treatment of colostrum-deprived kittens with equine IgG. *American Journal of Veterinary Research*, 2003, 64, 969-975.

Dakshinkar NP, Kalorey DR, Harne SD, Bhojne GR, Sarode DB. Bacteriological investigation of canine colostrums. *Indian Veterinary Journal*, 2001, 78, 172-173.

Day MJ. *Clinical immunology of the dog and cat*, Manson Publishing Ltd; 1 edition, 1999, 12.

Day MJ. Immune system development in the dog and cat. *Journal of Comparative Pathology*, 2007, 137, supplement 1, S10-S15.

Delouis C, Houbedine LM, Richard P. La Lactation. In : La reproduction chez les mammifères et l'homme. INRA editions-Ellipses, Paris, 2001, Thibault C, Levasseur MC coord, 580-610.

Euzéby J.P. Présentation générale du fonctionnement du système immunitaire spécifique, photocopiés de cours de A1, ENVT, 2008.

Faldyna, M., Leva, L., Knotigova, P., Toman, M. Lymphocytes subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2001, 82, 2-37.

Farstad, W. Perinatal puppy death in the dog I. Etiology and pathogenesis. *Norsk Veterinaertidsskrift*, 1983, 95, 563-566.

Favier F. Avortements et mortalité néonatale en élevage canin : approche pratique du vétérinaire. Thèse pour le doctorat vétérinaire ENVA, 2001, numéro 39.

Foisnet A. Variabilité de la production de colostrum par la truie : implication des changements endocriniens et métaboliques en période peripartum. Thèse de doctorat, biologie et agronomie. INRA Rennes 2010.

Foley JA, Otterby DE. Availability, storage, treatment, composition and feeding of surplus colostrum: A review. *Journal of Dairy Science*, 1978, 61(8), 1033-1060.

Fontbonne A, Buff S, Garnier F. Données récentes en physiologie et endocrinologie sexuelles dans l'espèce canine. *Le Point Vétérinaire*, 2000, 31 (209), 395 – 401.

Gandotora VK, Dwivedi PN, Singla VL, Kochhar HPS. Studies on the isolation, identification and in vitro drug sensibility of the pathogens from bitch colostrum causing neonatal mortality. *The Indian Veterinary Journal*, 1994, 71, 1253-1254.

Gayraud V. Physiologie de la reproduction des mammifères, photocopiés de cours de A1, ENVT 2007.

Gill MA. Perinatal and late neonatal mortality in the dog. Thesis submitted to The University of Sydney for the degree of Doctor of Philosophy, 2001.

Gillette DD and Filkins M. Factors affecting antibody transfer in the newborn puppy. *American Journal of Physiology*, 1966, 210, 419 - 422.

Godden SM, Smith S, Feirtag JM. Effect of on-farm Commercial batch pasteurization of colostrum and serum immunoglobulin concentrations in dairy calves. *Journal Dairy Science* 2003, 86, 1503-1512.

Greene, CE. Canine viral enteritis. In: *Clinical Microbiology and Infectious Diseases in the Dog and Cat*, Green. C. E.(Ed) W. B. Saunders Co. Philadelphia, 1984, 437 - 460.

Halliday R. Immunity and health in young lambs. *Veterinary Record* 1978, 103, 489-492.

Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P. *Chiens en croissance. Nutrition Clinique des animaux de compagnie*, 2000, 4th edition, Topeka : Mark Morris Institute, 262-269.

Head JR, Beer AE. In vivo and in vitro assessment of the immunologic role of leukocytic cells in milk, in Ogra PL, Dayton D (ed). *Immunology of breast milk*, New York, Raven Press, 1979, pp 207-225.

Heddle RJ, Rowley D. Dog Immunoglobulins. *Immunology*, 1975, 29, 185.

Herbert Y, Reynolds HY, Johnson JS. Quantitation of canine immunoglobulins. *The Journal of immunology*, 1970, 105, 698-703.

Hine BC, Hunt PW, Beasley AM, Windon RG, Glover SA, Colditz IG. Selective transport of IgE into ovine mammary secretions. *Research in Veterinary Science*, 2010, 89, 184–190.

Holmes MA, Lunn DP. A study of bovine and equine immunoglobulin levels in pony foals fed bovine colostrum. *Equine Veterinary Journal*, 1991, 23, 116-118.

Jakoi ER, Cambier J, Saslow S. Transepithelial transport of maternal antibody : purification of Ig G receptor from the newborn rat intestine. *Journal of Immunology*, 1985, 135, 3360-3364.

Johnson J.L, Godden S.M, Molitor T, Ames T, et Hagman D. Effects of Feeding Heat-Treated Colostrum on Passive Transfer of Immune and Nutritional Parameters in Neonatal Dairy Calves. *Journal of Dairy Science* 2007, 90, 5189–5198

Kennedy LJ, Lunt M, Barnes A, McElhinney LM, Fooks AR. and Ollier WER. Factors influencing the antibody response of dogs vaccinated against rabies. *Vaccine*, 2007, 25, 8500-8507.

Klobasa F, Werhahn E, Butler JE. Composition of sow milk during lactation. *Journal Animal Science*, 1987, 64, 1458–1466.

Klopfenstein C, Couture Y, Martineau GP, Bouchard E. physiologie comparative de la lactation chez la truie et la vache. *Médecin vétérinaire du Québec*, 2002, 43, 52-56.

Krakovka S, Long D, Koestner A. Influence of transplacentally acquired antibody on neonatal susceptibility to canine distemper virus in gnotobiotic dogs. *Journal of Infectious Diseases*, 1978, 137, 605-608.

Lascelles AK, Beh KJ, Husband AJ. Origin of antibody in mammary secretion with particular reference to the IgA system. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1981, 137, 493–511.

Le Berre K. La mortalité néonatale du chiot. Thèse pour le doctorat vétérinaire ENVN, 1996, numéro 35.

Levy JK, Crawford CP, Collante WR, Papich MG. Use of adult cat serum to correct failure of passive transfer in kittens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2001, 219, 10, 1401-1405.

Lewis RM, Smith CA, Garfield L. Kinetics of antibody synthesis to particulate and soluble antigen in newborn pups and adult dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 1973, 34, 235-240.

Lilliehook I, Johannisson A, Hakansson L. Expression of adhesion and Fc γ -receptors on canine blood eosinophils and neutrophils studied by anti-human monoclonal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1998, 61, 181-193.

Lonnerdal B, Keen CL, Hyrley LS, Fisher GL. Developmental changes in the composition of Beagle dog milk, *American Journal of Veterinary Research*, 1981, 42, 662-666.

Lussier B, Pathologies des glandes mammaires chez le chien et le chat. *Médecin Vétérinaire du Québec*, 2002, 32, 67-69.

Mach JP, Pahud JJ. Secretory Ig A, a major immunoglobulin in most bovine external secretions. *The Journal of Immunology*, 1971, 106, p 552.

Nephew BC, Amico J, Cai HM, Walker AM, Bridges RS. Intracerebroventricular administration of the prolactin (PRL) receptor antagonist, S179D PRL, disrupts parturition in rats. *Reproduction*. 2007, 134, 155-160.

Neville MC, Morton J, Umemura S. Lactogenesis. The transition from pregnancy to lactation. *Pediatric clinics of North America*, 2001, 48, 35-52.

Newby TJ, Bourne J. The nature of the local immune system of the bovine mammary gland. *The Journal of Immunology*, 1977, 118, 461-465.

Nielen ALJ, Van der Gaag I, Knol BW, Schukken YH. Investigation of mortality and pathological changes in a 14-month birth cohort of boxer puppies. *Veterinary Record* 1998, 142, 602-606.

Norcross NL. Secretion and composition of colostrum and milk. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1982, 181, 10, 1057-1060

Pierce AE, Smith MW. The intestinal absorption of pig and bovine lactoglobulins and human serum albumin by the newborn pig. *The Journal of Physiology*, 1967, 190, 1-18.

Poffenbarger HM, Olson PN, Chandler ML, Seim B, Varman M. Use of adult dog serum as a substitute for colostrum in the neonatal dog. *American Journal of Veterinary Research*, 1991, 52, 8, 1221-1224.

Quigley JDIII, Martin KR, Dowlen HH. Addition of soybean trypsin inhibitor to bovine colostrum : effects on serum immunoglobulin concentrations in Jersey calves. *Journal of Dairy Science* 1995, 78 ; 886-892.

Quigley JDIII, Strohbehn RE, Kost CJ. Formulation of colostrum supplements, colostrum replacers and acquisition of passive immunity in neonatal calves. *Journal of Dairy Science* 2001, 84, 2059-2065.

Rainard P. Bacteriostatic activity of bovine lactoferrin in mastitic milk. *Veterinary Microbiology*, 1987, 13, 159-166.

Rumbaugh GE, Ardans AA, Ginno D, Trommershausen-Smith A. Identification and treatment of colostrums-deficient foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1979, 174, 273-276.

Rüsse I. Die Laktation der Hundin. *Zentralbl. Veterinaehrmed.* 1961, 8, 252-281.

Schafer-Somi S, Bar Schalder S, Aurich JE. Immunoglobulins in nasal secretions of dog puppies from birth to six weeks of age. *Research in Veterinary Science*, 2005, 78, 143-150.

Schreiber M, Kantimm D, Kirchhoff D, Heimann G and Bhargava AS. Concentrations in serum of IG G, Ig M and IgA and their age-dependance in beagle dogs as determined by a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 1992, 30, 775-778.

Segalini V. Le colostrum des carnivores domestiques. Thèse pour le doctorat vétérinaire ENVA, 2007, numéro 57.

Segalini V. Les caractéristiques du lait chez le chien et le chat. *Le Point Vétérinaire*, 2008, 291, 29 -32.

Sheldrake RF, Husband AJ, Watson DL, Cripps AW. Selective transport of serum derived Ig A into mucosal secretions. *The Journal of Immunology*, 1984, 132, 363-368.

Slade HB, Schwartz SA. Mucosal immunity : the immunology of breast milk. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1987 ; 80 : 348-358.

Société Centrale Canine, Inscriptions provisoires au LOF, Statistiques, rubrique « Plus d'Informations ». Disponible sur le site: <http://www.scc.asso.fr/Statistiques,242> (page consultée le 5 juin 2012).

Stokes C, Bourne JF. Mucosal immunity. In: Halliwell REW, Gorman NT, eds. Veterinary clinical immunology. Philadelphia: WB Saunders Co, 1989.

Suter M. Inaugural Dissertation, University of Zürich. 1977.

Tizard I. An introduction to veterinary immunology. Philadelphia WB saunders 2009.

Virtala AM, Grohn YT, Mechor GD. The effect of maternally derived immunoglobulin G on the risk of respiratory disease in heifers during their first 3 months of life. Preventive Veterinary Medicine. 1999 , 39; 25-37.

Voisin F. Estimation de la qualité immune du colostrum de truie en élevage. Thèse pour le doctorat vétérinaire ENVT, 2005, numéro 40.

Watson DL. Immunological functions of the mammary gland and its secretion. Comparative review. Australian journal of biological sciences 1980, 33, 403-422.

Weaver DM, Tyler JW, Vanmetre DC, Hosteler DE, Barrington GM. Passive transfer of colostrale immunoglobulins in calves. Journal of Veterinary Internal medicine, 2000, 14, 569-577.

White ME. The role of growth factors in canine and feline milk. Proceedings of the 1996 Iams Nutrition Symposium, Wilmington, USA, 89-96.

Widmann- Acanal B. Inauguration Dissertation, University of Hannover. 1992.

Wittum T.E, Perino L.J. Passive immune status at postpartum hour 24 and long-term health and performance of calves. American Journal of Veterinary Research 1995, 56, 1149-1154.

NOM : BERTIERI Marie-Blanche

TITRE DE LA THÈSE : Etude sur les concentrations en immunoglobulines des sécrétions mammaires de la chienne

RESUME :

La composition des sécrétions mammaires (dont le colostrum) dans l'espèce canine est mal connue. On sait que son rôle immunologique est très important puisque seulement 10% des Ig passent par voie transplacentaire chez les carnivores. Notre étude, menée sur 10 chiennes Beagle, décrit l'évolution des concentrations en immunoglobulines des sécrétions mammaires au cours des deux premiers mois de lactation. L'étude avait également pour objectif d'examiner la relation entre les concentrations sériques en immunoglobulines dans le sang de la mère et dans ses sécrétions mammaires. Trois classes d'immunoglobulines ont été dosées (G, M, A). Les deux principaux résultats de ce travail sont que le colostrum peut se définir chez la chienne comme la sécrétion des deux premiers jours post partum et qu'aucune relation n'a pu être mise en évidence entre les concentrations sériques et mammaires.

MOTS CLES : Colostrum, lait, chien, immunoglobulines, post partum, mamelle.

TITLE : Study of immunoglobulins concentration in dog mammary secretions.

ABSTRACT :

Dog mammary secretions composition is not well-known. The immunologic role of colostrum is however known to be very important because only 10% of Ig cross the placenta. Our study (on 10 bitches Beagle) describes the evolution of immunoglobulins concentration in mammary secretions during the two first months of lactation. The aim is also to consider the link between immunoglobulins concentration in the bitches' serum and in their mammary secretions. We could determine the quantity of three classes of immunoglobulins (G, M, A). The two main results are that colostrum in dogs can be defined by the mammary secretion during the two first days after parturition and that there is no relation between colostrum and serum Ig concentrations.

KEY WORDS: colostrum, milk, dog, immunoglobulins, mammary gland, post partum